

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Andrea Telišman

778/PI

**KONTROLA KVALITETE
MLJEKA IZ MLJEKOMATA NA
PODRUČJU ZAGREBAČKE
ŽUPANIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom *prof. dr.sc. Rajke Božanić* te uz pomoć *doc. dr. sc. Irene Barukčić* i *dr. sc. Katarine Lisak Jakopović*.

Zahvale...

Prvenstveno zahvaljujem mentorici Rajki Božanić koja je svojom susretljivošću i uvijek savršeno konstruktivnim kritikama pomogla u izradi ovog rada.

Veliko hvala asistenticama Ireni i Katarini koje su uvelike doprinjele izradi rada svojim znanjem, zalaganjem, strpljenjem, te korisnim savjetima. Od srca hvala i Snježani, duši laboratorija, na pomoći i ugodnoj formalnoj i neformalnoj atmosferi tijekom eksperimentalne faze rada te na vrijednim praktičnim i životnim savjetima.

Kolegicama Željki, Moniki i Hedvigi hvala na podršci, pomoći i savjetima od prve do zadnje godine studija. „PBF familiji“ hvala na nezaboravnim studentskim danima. Mom dečku Bruni i prijateljici Valentini neizmjereno hvala što su bili moj razum i moja savjest.

Posebno hvala roditeljima koji su svojim odricanjem tijekom cijelog studija omogućili da ovaj period života uspješno privedem kraju i nekom novom početku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

KONTROLA KVALITETE MLIJEKA IZ MLJEKOMATA NA PODRUČJU ZAGREBAČKE ŽUPANIJE

Andrea Telišman, 778/PI

Sažetak: Mlijeko je vrlo kvarljiva namirnica, stoga je kontrola kvalitete u pogledu higijenske ispravnosti i sastava iznimno bitna. Cilj istraživanja bio je utvrditi kemijski sastav i mikrobiološku ispravnost mlijeka prikupljenih iz 11 različitih mljekomata na području grada Zagreba i okolice, te ispitati odgovara li ona zakonski postavljenim kriterijima. Također je cilj bio utvrditi razlike u uzorcima sirovog mlijeka prikupljenim u dva različita godišnja doba. Uzorcima mlijeka određen je udio mliječne masti, proteina, laktoze, suhe tvari, bezmasne suhe tvari i pepela. Higijenska kvaliteta mlijeka određena je na temelju broja somatskih stanica i ukupnog broja mikroorganizama. Rezultati su pokazali da uzorci mlijeka kemijskim sastavom udovoljavaju odredbama Pravilnika o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17). Međutim, mikrobiološka analiza je dala zabrinjavajuće rezultate gdje niti jedan uzorak nije udovoljavao odredbama Zakona o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13). Prosječan broj somatskih stanica/mL u sirovom mlijeku na zadovoljavajućem je nivou i kod 77% uzoraka iznosi <400.000 BSS/mL.

Ključne riječi: *kontrola kvalitete, svježe sirovo mlijeko, mljekomat, MilkoScan, mikrobiološka ispravnost*

Rad sadrži: 48 stranica, 17 slika, 9 tablica, 61 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr.sc. *Rajka Božanić, prof.*

Pomoć pri izradi: Dr.sc. *Katarina Lisak Jakopović, viši asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić*
2. Prof.dr.sc. *Rajka Božanić*
3. Prof.dr.sc. *Ksenija Markov*
4. Prof.dr.sc. *Jadranka Frece (zamjena)*

Datum obrane: 25. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology and Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk Products

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

THE QUALITY OF RAW MILK FROM A VENDING MACHINE ON THE AREA OF ZAGREB COUNTY

Andrea Telišman, 778/PI

Abstract: Milk is a very perishable food so quality control of raw milk is very important in terms of protecting the health and safety of consumers. The aim of the research was to determine the chemical composition and microbiological validity of the milk collected from 11 different vending machines in the area of Zagreb, and to examine whether it complies with the legally set criteria. The aim was also to establish the differences in samples of raw milk collected in two different seasons. In the milk samples share of milk fat, protein, lactose, dry matter and ash were determined. Hygiene quality of milk was determined by the number of somatic cells and the total number of microorganisms. The results showed that chemical composition of raw milk from a vending machine samples matches the set of legal criteria. However, the microbiological analysis has given bad results where no sample was within legal criteria. The average number of somatic cells per mL in raw milk is at a satisfactory level and 77% of the milk samples were <400,000 BSS /mL.

Keywords: *quality control, fresh raw milk, vending machine, MilkoScan, microbiological quality*

Thesis contains: 48 pages, 17 figures, 9 tables, 61 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ph.D. *Rajka Božanić, Full Professor*

Technical support and assistance: Ph.D. *Katarina Lisak Jakopović, Senior Assistant*

Reviewers:

1. Ph.D. *Irena Barukčić, Assistant Professor*
2. Ph.D. *Rajka Božanić, Full Profesor*
3. Ph.D. *Ksenija Markov, Full Profesor*
4. Ph.D. *Jadranka Frece, Full Profesor (substitute)*

Thesis defended: 25th Sempتمبر 2017

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Važnost analize mlijeka	2
2.2. Kontrola kvalitete mlijeka u RH	3
2.2.1. Zahtjevi kojima mora udovoljavati svježe sirovo mlijeko pri otkupu	4
2.3. Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem mljekomata	5
2.4. Ispitivanje kvalitete mlijeka	7
2.4.1. Mastitis	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJAL.....	11
3.1.1. Uzorci mlijeka.....	11
3.2. METODE RADA	12
3.2.1. Priprema uzoraka mlijeka za analizu	12
3.2.2. Određivanje kiselosti.....	12
3.2.2.1. Određivanje kiselosti mlijeka pH-metrom	12
3.2.2.2. Titracijska metoda po Soxhlet-Henklu	13
3.2.3. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku.....	14
3.2.4. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku	16
3.2.4.1. Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari	16
3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari).....	17
3.2.6. Mikrobiološke analize mlijeka	18
3.2.6.1. Priprema hranjivih podloga	19
3.2.6.2. Priprema fiziološke otopine za decimalna razrjeđenja.....	20
3.2.6.4. Priprema decimalnih razrjeđenja	21
3.2.6.5. Nacjepljivanje i inkubacija zdjelica	22
3.2.6.6. Očitavanje rezultata	23
3.2.7. Instrumentalna metoda analize – MilkoScan FT1.....	23
3.2.8. Instrumentalna metoda analize – Fossomatic Minor.....	24
3.2.9. Statistička analiza.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Fizikalno - kemijske analize mlijeka.....	26
4.2. Mikrobiološke analize mlijeka	34
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA.....	44

1. UVOD

Mlijeko je najkompletnija prirodna tekućina jer sadrži sve tvari neophodne za očuvanje zdravlja i normalnu funkciju ljudskog organizma. Složenog je i promjenjivog sastava, bijele do žućkastobijele boje, karakterističnog okusa i mirisa. Luči se iz mliječne žlijezde ženki sisavaca određeno vrijeme nakon poroda, prvenstveno radi prehrane mladunčadi. Naziv mlijeka ovisi o njegovom podrijetlu (mlijeko žene, kravlje mlijeko, kozje, ovčje, bivolje, kobilje i dr.), no pod pojmom „mlijeko“ podrazumijeva se isključivo kravlje mlijeko, a druge vrste navode se isticanjem podrijetla. Sve vrste mlijeka sadrže iste sastojke, međutim udjeli i međusobni odnosi sastojaka, pa i njihova struktura, mogu biti vrlo različiti (Tratnik i Božanić, 2012).

U Republici Hrvatskoj kao i u zemljama Europe i svijeta, unazad nekoliko godina povećava se trend svakodnevne kupovine i konzumacije sirovog mlijeka iz mljekomata. Premda je taj proces kod nas nešto sporiji jer u cijeloj zemlji imamo tek oko 40 mljekomata. Mlijeko koje se prodaje na taj način je sirovo kravlje mlijeko, dakle mlijeko koje nije podvrgnuto termičkom postupku, tj. nije zagrijavano na temperaturu iznad 40 °C. Međutim, sirovo mlijeko je vrlo osjetljiva namirnica koja podliježe brzim promjenama ako se njome ne rukuje na pravilan i higijenski način. Pritom je potrebno osigurati čistoću svih uređaja, aparature i opreme s kojima mlijeko dolazi u doticaj pa tako i mljekomata. Sirovo mlijeko osim mikrobne kontaminacije može biti onečišćeno i mehaničkim nečistoćama te patvoreno razvodnjavanjem. Iz tog razloga je ispitivanje kvalitete i ispravnosti mlijeka vrlo važno područje mljekarstva kojim se jamči njegova sigurnost za konzumaciju (Sabadoš, 1996). Općenito, sirovo mlijeko namijenjeno za konzumaciju ljudi mora udovoljiti zahtjevima navedenim u Zakonu o hrani (NN 81/13) i biti slobodno od patogena.

Ovo istraživanje imalo je za cilj utvrditi mikrobiološku i kemijsku sliku sirovog mlijeka iz mljekomata na području grada Zagreba i bliže okolice, te ukazati na razlike u sastavu mlijeka tijekom dva godišnja doba. U tu svrhu odrediti će se kemijski parametri mlijeka (mliječna mast, proteini, laktoza, suha tvar, titracijska kiselost) klasičnim metodama te primjenom uređaja MilkoScan™ FT 1. Također ispitati će se ukupan broj mikroorganizama u mlijeku, te broj somatskih stanica (BSS) pomoću Fossomatic™ Minor-a. Ujedno je i cilj rada utvrditi udovoljava li kemijska i higijenska kvaliteta mlijeka s mljekomata uvjetima propisanim Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Važnost analize mlijeka

Na količinu i kvalitetu proizvedenoga mlijeka utječu sljedeći čimbenici:

- genetski (pasmina, odnosno genotip),
- fiziološki (dob, stadij i redoslijed laktacije, zdravstveno stanje i tjelesna masa krave), te
- okolišni (način držanja, mikroklima, hranidba, mužnja, postupak s mlijekom nakon mužnje) (Rajčević i sur., 2003).

Mlijeko, kao vrlo složena namirnica, biološka je tekućina promjenjivog sastava. Odnos pojedinih sastojaka u mlijeku nije stalan i varira ovisno o spomenutim čimbenicima, pri čemu kemijski sastav mlijeka pojedinih krava znatnije varira nego sastav skupnog mlijeka određenog područja (Tratnik, 1998). Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, neutralnog pH i visokog aktiviteta vode, sirovo mlijeko predstavlja dobar medij za rast mikroorganizama (Claeys i sur., 2013). Uvjeti u kojima se čuva svježe sirovo mlijeko a posebice držanje na visokim temperaturama, mogu uzrokovati niz promjena na mlijeku. Kada se u obzir uzme i mogućnost patvorenja mlijeka, jasna je važnost ispitivanja sastava i svojstava mlijeka kako bismo mogli odrediti njegovu kakvoću. Mlijeko sadrži niz fizikalno kemijskih sastojaka, te se u praksi koriste uobičajeni podaci o sadržaju vode, mliječne masti, proteina, laktoze i sadržaju pepela te ukupnoj bezmasnoj suhoj tvari (Bosnić, 2003). Prosječne granične vrijednosti kemijskog sastava mlijeka prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Prosječni sastav svježeg mlijeka (Tratnik i Božanić, 2012)

<i>Sastojci</i>	<i>Udio sastojaka (%)</i>
<i>Voda</i>	86,0 – 89,0
<i>Suha tvar</i>	11,0 -14,0
<i>Mast</i>	3,2 – 5,5
<i>Proteini</i>	2,6 – 4,2
<i>Laktoza</i>	4,6 – 4,9
<i>Mineralne tvari (pepeo)</i>	0,6 - 0,8

Razlozi ispitivanja mlijeka su raznovrsni, a mogu biti ekonomski, sanitarni, tehnološki, znanstveni, selekcijski i savjetodavni (Sabadoš, 1996).

Prilikom donošenja zaključaka o kvaliteti u trenutku analize, treba računati s određenim zajedničkim svojstvima različitih metoda i postupaka ispitivanja mlijeka:

- Svaka pojedina analiza može dati odgovor na samo jedan, sasvim određeni dio cijelog kompleksa svojstava koja čine ukupnu kvalitetu.
- Iz rezultata samo jedne analize može se samo u izuzetnim slučajevima zaključiti o kvaliteti konačnog proizvoda.
- Rezultat svake pojedine analize bit će tim vrijedniji, što ga je moguće više i bolje usporediti s rezultatima drugih kontrolnih metoda i na temelju toga procijeniti njegovu vrijednost (Božanić i sur., 2010).

Analize i kontrole mlijeka mogu biti kemijske (udio masti, proteina, laktoze i vode), biološke (prisustvo specifičnih enzima), fizikalne (gustoća, ledište), senzorske (okus, miris, izgled) i mikrobiološke (broj i vrsta mikroorganizma).

2.2. Kontrola kvalitete mlijeka u RH

Kvaliteta mlijeka ovisi o mnogo čimbenika koji uvjetuju veće ili manje razlike u sastavu. Već pri mužnji jedne životinje, u istom danu, ne dobiva se mlijeko jednakog sastava a još je veća neujednačenost u uzorcima mlijeka tijekom razdoblja laktacija u različitim danima mužnje. Prema tome kontrola kvalitete mlijeka iznimno je bitno područje mljekarstva. Iako je to vrlo delikatna i težak zadatak, vrlo je važan za proizvođače mlijeka, mljekare, prodavače i kontrolnu službu koji svojim odgovornim radom moraju potrošačima jamčiti kvalitetu mlijeka (Sabadoš, 1996). Odluka o uključivanju Hrvatske u međunarodne integracije, posebice u Europsku uniju, uvjetovala je prilagođavanje i izmjene niza zakonskih odredbi koje su imale utjecaja i na sektor proizvodnje i prerade mlijeka. Trenutno su važeći sljedeći Pravilnici vezani za analizu svježeg mlijeka i prodaju putem mljekomata:

- Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (Pravilnik, 2017a)
- Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (Pravilnik, 2017b)
- Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (Pravilnik, 2016)
- Pravilnik o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (Pravilnik, 2015)

Ministarstvo poljoprivrede je 2001. godine donijelo odluku o uspostavi Središnjeg laboratorija za kontrolu kvalitete mlijeka (SLKM) u Križevcima. Referentni laboratorij je uspostavljen u okviru Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu (Stručić, 2015).

2.2.1. Zahtjevi kojima mora udovoljavati svježe sirovo mlijeko pri otkupu

Pravilnikom o kakvoći svježeg sirovog mlijeka propisani su zahtjevi kojima mora udovoljavati svježe sirovo mlijeko pri otkupu. Kravlje mlijeko mora udovoljavati sljedećim zahtjevima kvalitete (Pravilnik, 2017a):

- da sadrži najmanje 3,2 % mliječne masti
- da sadrži najmanje 3,0 % proteina
- da sadrži najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti
- da mu je gustoća od 1,028 do 1,034 g/cm³ na temperaturi od 20°C
- da mu je kiselinski stupanj od 6,6 do 6,8°SH, a pH vrijednost od 6,5 do 6,7
- da mu točka leđišta nije viša od -0,517°C
- da mu je rezultat alkoholne probe sa 72 % etilnim alkoholom negativan.

Sirovo mlijeko mora potjecati od muznih životinja kod kojih je do poroda najmanje 30 dana, ili je od poroda prošlo više od osam dana. Sirovo mlijeko mora imati svojstven izgled, boju, miris i okus (Pravilnik, 2017a).

Sirovo mlijeko ne smije sadržavati rezidue iznad dozvoljene količine koje imaju farmakološko ili hormonalno djelovanje te antibiotike, pesticide, deterdžente i druge štetne tvari koje mijenjaju organoleptička svojstva mlijeka. Sirovo mlijeko ne smije sadržavati mehaničke nečistoće i ne smije sadržavati dodane količine vode (Pravilnik, 2017a).

Kvaliteta sirovog mlijeka mora odgovarati Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 81/13) i biti usklađena s kriterijima iz Uredbe komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu

Sirovo mlijeko može maksimalno sadržavati 400.000 somatskih stanica po mL, a prema nacionalnim propisima i standardima EU-a maksimalno dopušteni broj živih stanica bakterija u 1 mL sirovog mlijeka može biti 100.000 (10⁵ CFU/mL). Prema prosječnom broju mikroorganizama mlijeko se razvrstava u dva razreda kako je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Razvrstavanje sirovog mlijeka u razrede (Pravilnik, 2017a)

<i>Klasa</i>	<i>Broj mikroorganizama/mL</i>	<i>Broj somatskih stanica</i>
I	≤ 100.000	≤ 400.000
II	> 100.000	> 400.000

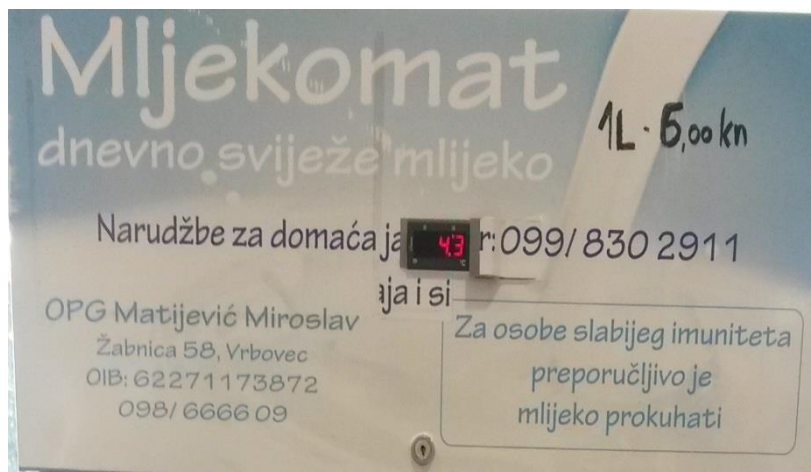
2.3. Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem mljekomata

Mljekomat je automatizirani sustav za točenje i prodaju rashlađenih prehrambenih tekućina. Mljekomat ima vlastito hlađenje, miješalicu i sustav za ispiranje. U mljekomat se mogu postaviti hermetički zatvoreni tankovi od 200, 250 i 300 litara. Naplata se vrši kovanicama, uz mogućnost naplate novčanicama. Iako je primarno namijenjen za prodaju mlijeka, ovaj sustav se može koristiti i za prodaju sokova i sličnih prehrambenih tekućina (Anonymous 1, 2014). Slika 1. prikazuje dva tipa mljekomata s kojih su uzimani uzorci za potrebe ovog istraživanja. Na mljekomatu koji se na slici nalazi lijevo moguća je kupnja samo svježeg sirovog mlijeka, dok je na mljekomatu desno, uz mlijeko moguće kupiti i druge mliječne proizvode.



Slika 1. Prikaz dva tipa mljekomata (vlastita fotografija)

Prema Pravilniku o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (NN 84/16) prodaju sirovog mlijeka na jednom automatu može obavljati samo jedan proizvođač mlijeka i to od životinja iz vlastitog uzgoja. Mlijeko koje se prodaje putem mljekomata je sirovo mlijeko, dakle ono koje nije podvrgnuto termičkom postupku, tj. nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) izdala je Znanstveno mišljenje o javno - zdravstvenom riziku vezanom za konzumacijom mlijeka za piće gdje je obavezno upozoriti potrošače da je preporučena toplinska obrada mlijeka prije konzumacije (EFSA, 2015). Stoga se unazad dvije godine preporuka nalazi na mljekomatima što prikazuje slika 2.



Slika 2. Preporuka prokuhavanja za osobe slabijeg imuniteta (vlastita fotografija)

Ovakav način prodaje temelji se na zakonskoj osnovi navedenoj u:

- Pravilniku o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (Pravilnik, 2016), čl. 10. *Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem automata (mljekomati)*, i
- Pravilniku o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (Pravilnik, 2015).

Proizvođači sirovog mlijeka moraju osigurati ispunjavanje sljedećih zahtjeva:

Mlijeko namijenjeno za javnu potrošnju mora potjecati od životinja (Pravilnik, 2016):

- koje ne pokazuju simptome zaraznih bolesti prenosivih na ljude putem mlijeka koje su dobrog općeg zdravstvenog stanja i ne pokazuju znakove bolesti
- koje bi mogle dovesti do kontaminacije mlijeka; nemaju vidljive upale vimena koje nemaju nikakve ozljede vimena
- kojima nisu davane nedopuštene tvari ili proizvodi
- kod kojih su se poštivale propisane karence ako su im davani odobreni veterinarsko-medicinski proizvodi.

Proizvođač mlijeka u skladu s posebnim propisima treba ispunjavati zahtjeve za brucelozu i tuberkulozu. Opremu za mužnju i prostor za skladištenje mlijeka mora se zaštititi od štetočina, odvojiti od prostora u kojem se drže krave te ih redovito održavati u čistom i ispravnom stanju na način da održavanje higijene olakša korištenjem glatkih, lako perivih površina koje se mogu čistiti i po potrebi dezinficirati. Kod same mužnje moraju se osigurati higijenski uvjeti kako bi se mlijeko zaštitilo od kontaminacije. Osoba koja obavlja mužnju nosi odgovarajuću čistu radnu odjeću, održava osobnu higijenu i ne smije bolovati od bolesti koja se može prenijeti hranom (niti je kliconoša) te ne posjeduje kožne infekcije, rane ili inficirane ozljede kao ni dijareju (Pravilnik, 2016).

Mlijeko se odmah nakon mužnje obavljene u higijenskim uvjetima hladi na odgovarajuću propisanu temperaturu ($\leq 8^{\circ}\text{C}$ kod svakodnevne otpreme mlijeka ili $\leq 6^{\circ}\text{C}$ ako nije svakodnevna otprema). U tu svrhu proizvođač mlijeka treba imati instaliranu odgovarajuću opremu za hlađenje (Pravilnik, 2016).

2.4. Ispitivanje kvalitete mlijeka

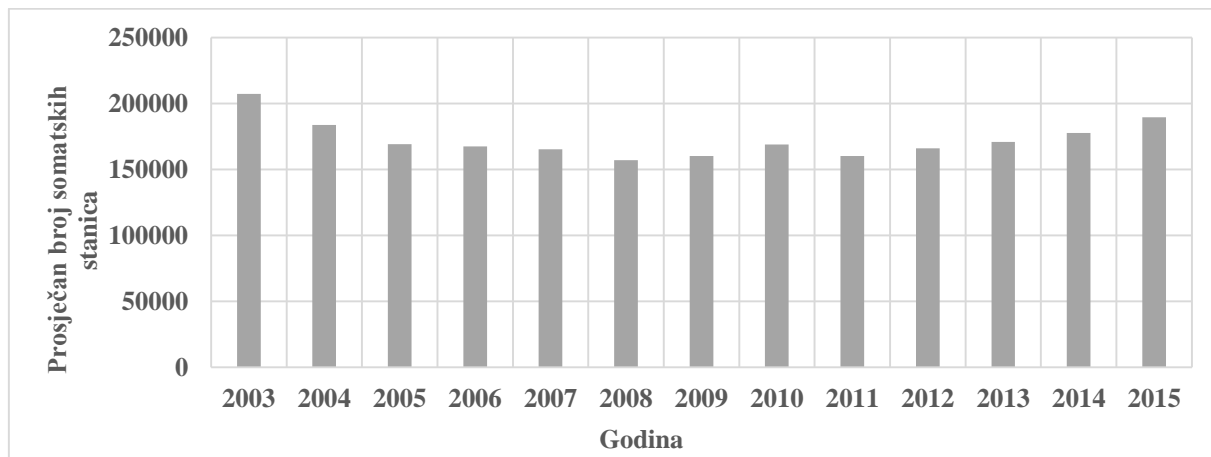
Svrha ispitivanja mlijeka je dokazivanje njegove ispravnosti odnosno kvalitete. Ono ne smije promijeniti svoja osnovna svojstva, odnosno ne smije biti pokvareno niti patvoreno već mora odgovarati smislu definicije mlijeka, neovisno koristi li se za izravnu potrošnju ili kao sirovina za daljnju preradu (Sabadoš, 1996).

Središnji laboratorij za kontrolu kvalitete mlijeka (SLKM) započeo je s radom 2002. godine s ciljem osiguranja jedinstvenog, neovisnog utvrđivanja kvalitete mlijeka za sve isporučitelje i mljekare u RH kao i radi prilagodbe zahtjevima EU-a i postizanja visoke kvalitete mlijeka. Osim uzoraka mlijeka koji se analiziraju radi pune provedbe Pravilnika o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka, u Laboratoriju se ispituju i uzorci mlijeka uzeti u sklopu kontrole mliječnosti pojedinih grla, koja se obavlja kao sastavni dio provedbe uzgojnih programa. Temeljem rezultata laboratorijskih ispitivanja, proizvođačima mlijeka definira se cijena isporučenog mlijeka (HPA, 2012).

Ispitivanje kvalitete mlijeka provodi se raznim metodama. Razvojem tehnologije u području laboratorijske analize mlijeka pojavili su se brojni uređaji poput MilkoScan-a i Fossomatic-a koji su značajno olakšali i skratili vrijeme provedbe analiza. Međutim, u širokom opsegu tih uređaja potrebno je uzeti u obzir njihovu ispravnost, točnost i preciznost. U SLKM-u utvrđivanje kemijskog sastava mlijeka provodi se infracrvenom spektrofotometrijom. Ispitivanje se provodi na MilkoScan analizatorima u sklopu Comby sustava zajedno s analizatorima Fossomatic za utvrđivanje broja somatskih stanica.

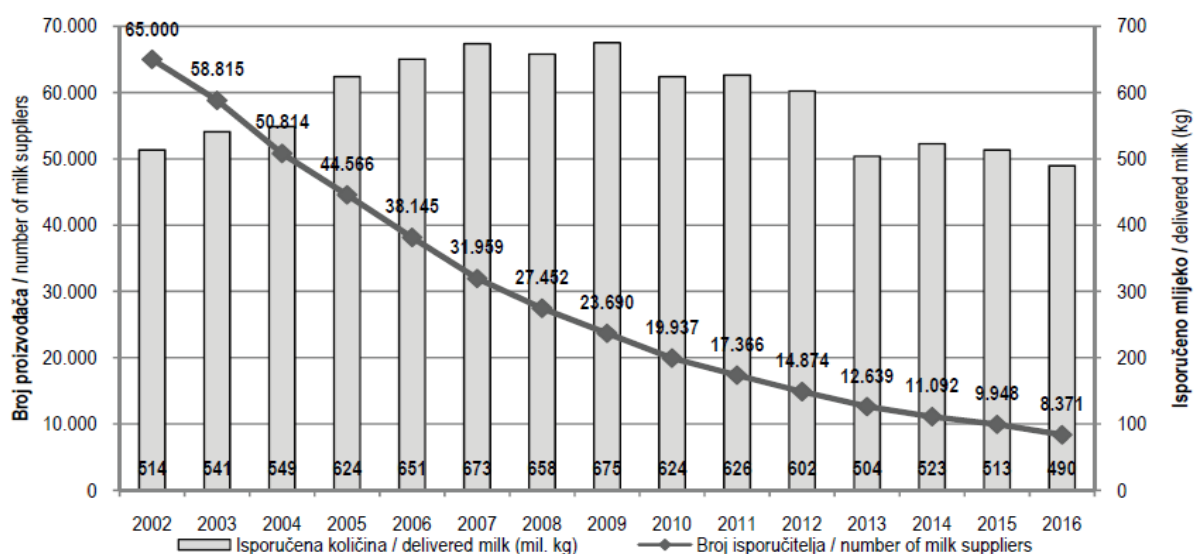
Broj somatskih stanica u mlijeku utvrđuje se fluoro-opto-elektronskom metodom te je jedan od parametara za ocjenu higijenske ispravnosti mlijeka. Mlijeko koje ima prosječan broj somatskih stanica manje od 400 000 BSS/mL razvrstava se u I. razred mlijeka, dok mlijeko koje ima više od 400 000 somatskih stanica po mililitru razvrstava se mlijeko II. razreda (HPA, 2012).

Slika 3 prikazuje prosječne vrijednosti broja somatskih stanica isporučenog kravljeg mlijeka u SLKM. Vidljivo je smanjenje količine mlijeka koje sadrži broj somatskih stanica više od 400 000 BSS/mL, što govori o povećanju kvalitete mlijeka u periodu od 2003.-2015. godine, premda je unazad 3 godine broj somatskih stanica u mlijeku porastao.

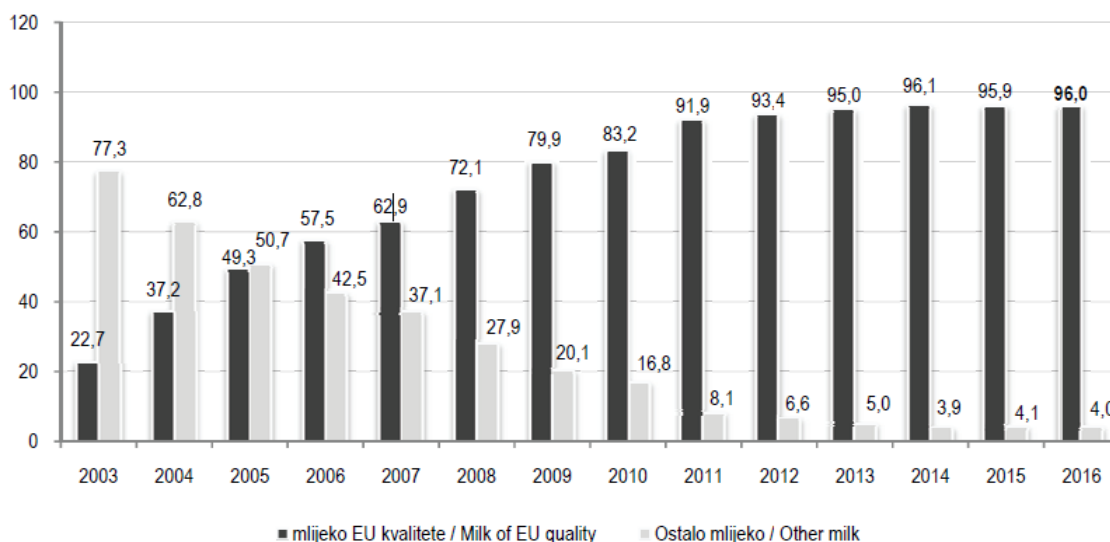


Slika 3. Prosječne vrijednosti broja somatskih stanica isporučenog kravljeg mlijeka (HPA, 2015)

Od ulaska Hrvatske u EU broj proizvođača mlijeka se nažalost smanjuje što prikazuje slika 4. 2015. godinu obilježilo je ukidanje mliječnih kvota u EU, čime je povećana proizvodnja mlijeka u zemljama Unije te je stvoren dodatni pritisak na smanjivanje cijena sirovog mlijeka i gotovih mliječnih proizvoda u RH. Osim toga deflacija cijena, generirana lokalnim i globalnim makroekonomskim promjenama, velika je opasnost s kojom se suočava mljekarska industrija zadnjih godina. Unatoč tome raste kvaliteta mlijeka I. kategorije što možemo vidjeti na slici 5.



Slika 4. Broj isporučitelja i isporučenih količina kravljeg mlijeka u razdoblju od 2002. do 2016. (HPA, 2016)



Slika 5. Omjer mlijeka I razreda (mlijeko EU kvalitete) i ostalog mlijeka po godinama (HPA, 2016)

2.4.1. Mastitis

Upale mliječne žlijezde muznih krava na samom su vrhu među uzrocima šteta u mliječnom govedarstvu (Benić, 2011). Broj somatskih stanica u mlijeku predstavlja danas međunarodno priznati pokazatelj zdravstvenog stanja vimena pa ih u mlijeku određujemo radi kontrole zdravstvenog stanja mliječne žlijezde, sprečavanja pojave mastitisa i poboljšanja kvalitete mlijeka. Njihov se broj u mlijeku zdravih krava kreće od 50.000 stanica/mL do 200.000 stanica/mL (Kalit i sur., 2000).

Mliječna žlijezda može se inficirati ulaskom mikroorganizama kroz sisni kanal (galaktogeno), preko ozlijeđene kože (limfogeno) i krvlju (hematogeno). Najčešći uzročnici upale su: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus spp.* i koliformni mikroorganizmi. Upalu mogu uzrokovati i mikoplazme, kvasci, plijesni, čak i alge (*Prototheca*) (Naglić i sur., 2005).

Povećan broj somatskih stanica posljedica je upale vimena, a odražava se promjenama u sekreciji i kemijskom sastavu mlijeka, fizikalnim, bakteriološkim i tehnološkim osobinama mlijeka (Antunac i sur., 1997). Promjene u kemijskom sastavu mlijeka mogu biti mnogostruke. Često veći broj somatskih stanica uvjetuje smanjenje količine laktoze za 10-20% čija je prosječna količina u mlijeku zdravog vimena oko 4,8%. Ukupan sadržaj proteina mlijeka ne mijenja se znatno, osim u međusobnom odnosu nekih frakcija. Enzimi iz somatskih stanica razgrađuju proteine pa se iz tog razloga javlja gorak okus mlijeka, greške u kiseljenju i smanjenje prinosa sira zbog otežanog zgrušavanja.

Jedan od uzroka slabe fermentacijske sposobnosti mlijeka u proizvodnji sira je povećanje pH vrijednosti i smanjenje titracijske kiselosti mlijeka krava s upalom vimena. Mlijeko mastičnih krava pokazuje promjene i u sadržaju minerala. Količina natrija i klora raste s porastom BSS, a količina kalija se smanjuje. Smanjuje se ukupna količina kalcija i magnezija, što uzrokuje poteškoće u koagulaciji pri proizvodnji sira. Smanjenje količine masti u mlijeku povećanjem broja somatskih stanica iznosi od 5-12% ili od 2-5g masti/kg mlijeka. Promjene sadržaja i sastava mliječne masti u mastičnom mlijeku u početku su relativno male, ali u slučaju dužeg trajanja infekcije vimena su znatne (Zdolec, 2011, Antunac i sur., 1997).

Promjene fizikalnih osobina mlijeka odnosno se na promjene pH vrijednosti i titracijske kiselosti. Kiselost mastičnog mlijeka kreće se u rasponu od 4,8 do 5,6°SH (lakši oblik upale) odnosno 3,2 do 4,0°SH (teži oblik upale). Određivanje pH vrijednosti mlijeka pomaže u dijagnosticiranju mastitisa. U mastičnom mlijeku pH vrijednost je povećana i iznosi od 6,8 do 6,9, a kod težih oboljenja i iznad 7,0 (Borčić, 2016, Harmon, 1994). U tablici 3 prikaz je promjene udjela sastojaka u mlijeku mastičnih krava.

Istraživanja su pokazala da je nepravilna upotreba lijekova u kontroli mastitisa glavni izvor pojave rezidua u mlijeku (Pintiće i sur., 2006). Ukoliko se proizvođači ne pridržavaju vremena karence, rezidue antimikrobnih lijekova mogu dospjeti do potrošača. Manji broj somatskih stanica znači bolju kvalitetu mlijeka za preradu i veću proizvodnju, što predstavlja korist za proizvođače, prerađivače i potrošače mlijeka (Hadžiosmanović, 2001., Bašić i sur., 2012).

Tablica 3. Promjene udjela sastojaka mlijeka povezane s povećanim BSS (Harmon, 1994)

<i>Sastojak</i>	<i>Normalno mlijeko (%)</i>	<i>Mlijeko s visokim BSS (%)</i>
<i>Suha tvar bez masti</i>	8,9	8,8
<i>Mliječna mast</i>	3,5	3,2
<i>Laktoza</i>	4,9	4,4
<i>Ukupni proteini</i>	3,61	3,56
<i>Natrij</i>	0,057	0,105
<i>Kloridi</i>	0,091	0,147
<i>Kalij</i>	0,173	0,157
<i>Kalcij</i>	0,12	0,04

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci mlijeka

Za istraživanje je korišteno 11 uzoraka svježeg sirovog mlijeka sakupljenih iz 11 različitih mljekomata pozicioniranih u Zagrebu i njegovoj okolici. Sirovo mlijeko uzorkovano je tijekom zime/proljeća 2017. (od 14.2. do 7.3.) i u proljeće/ljeto 2017. (od 23.5. do 31.5.). Ukupno je prikupljeno 53 uzoraka mlijeka, 33 u prvom uzorkovanju te 20 uzoraka u drugom. Tijekom drugog obilaska, uzorak 6 nije prikupljen jer mljekomat više nije bio postavljen na toj lokaciji. Prilikom analize sirovo mlijeko je uzorkovano iz svakog pojedinog mljekomata u različitim vremenskim razmacima. Mlijeko je skladišteno u sterilne staklene boce s poklopcem od 1 L i dostavljeno na analizu najkasnije 1h od uzorkovanja. Tablica 4 prikazuje uzorke sirovog mlijeka te lokacije mljekomata i datum uzorkovanja.

Tablica 4. Uzorci svježeg mlijeka s mljekomata

Uzorak	Lokacija mljekomata	Razdoblje uzorkovanja				
		Zima/proljeće			Proljeće/ljeto	
1	Dubrava - Ulica Vile Velebita, Zagreb	14.2.17.	21.2.17.	1.3.17.	23.5.17.	29.5.17.
2	Dubrava - Mrzlopoljska ulica, Zagreb	14.2.17.	21.2.17.	1.3.17.	23.5.17.	29.5.17.
3	Srednjaci, Zagreb	15.2.17.	22.2.17.	2.3.17.	24.5.17.	30.5.17.
4	Savica, Zagreb	14.2.17.	21.2.17.	1.3.17.	23.5.17.	29.5.17.
5	Nehajska ulica, Zagreb	15.2.17.	22.2.17.	2.3.17.	24.5.17.	29.5.17.
6	Vlaška ulica, Zagreb	15.2.17.	22.2.17.	2.3.17.	_*	_*
7	Tržnica Vrapče, Zagreb	16.2.17.	23.2.17.	3.3.17.	25.5.17.	30.5.17.
8	Tržnica Špansko, Zagreb	16.2.17.	23.2.17.	3.3.17.	25.5.17.	30.5.17.
9	Tržnica Gajnice, Zagreb	16.2.17.	23.2.17.	7.3.17.	25.5.17.	31.5.17.
10	Tržnica Samobor	16.2.17.	23.2.17.	7.3.17.	25.5.17.	31.5.17.
11	Zaprešić	16.2.17.	23.2.17.	7.3.17.	25.5.17.	31.5.17.

*mljekomat se više ne nalazi na toj lokaciji

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema uzoraka mlijeka za analizu

Bez obzira na analize koje se provode, mlijeko treba potpuno promiješati odnosno homogenizirati kako ne bi došlo do izdvajanja mliječne masti na površinu. U suprotnom rezultati mogu biti pogrešni. Uzorak treba uzeti odmah nakon miješanja, dok se mlijeko još giba. Uz miješanje mlijeko se zagrijava na 38-40°C te potom hladi do 20°C. Za potrebe određivanja udjela suhe tvari i mineralnih tvari, uzorci mlijeka mogu se zamrznuti. Postupak odmrzavanja provodi se u toploj vodi (40-50°C) uz miješanje. Uzorci svježeg sirovog mlijeka namijenjeni za mikrobiološku analizu konzerviraju se na niskim temperaturama (1-4°C) ako se analizi ne pristupa odmah. Obavezno je koristiti sterilno posuđe i pribor a postupak provoditi u aseptičnim uvjetima (Božanić i sur., 2010).

3.2.2. Određivanje kiselosti

Kiselost mlijeka i mliječnih prerađevina najčešće se određuje pH-metrom te titracijskim metodama (Sabadoš, 1998).

3.2.2.1. Određivanje kiselosti mlijeka pH-metrom

Potreban pribor:

- pH-metar
- destilirana voda
- staklena čaša od 100 mL
- staničevina

Potrebni reagensi:

- otopina KCl
- puferi za kalibraciju elektrode pH-metra

Postupak rada:

Elektrodu pH-metra potrebno je isprati destiliranom vodom i posušiti staničevinom. Prije početka provođenja analize potrebno je provesti kalibraciju elektrode pH-metra prema uputama

proizvođača. Kada je kalibracija provedena, pristupa se daljnjem provođenju analize. Elektroda se lagano uroni u čašu s mlijekom.

Očitavanje se vrši u trenutku ustaljenja pH vrijednosti na zaslonu. Između dva mjerenja elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom i posušiti staničevinom. Nakon obavljenih očitavanja, elektroda pH-metra se ispire destiliranom vodom, pobriše staničevinom, uroni u otopinu KCl-a te tako čuva do iduće uporabe (Božanić i sur., 2010).

3.2.2.2. Titracijska metoda po Soxhlet-Henkeli

Princip:

Metoda po Soxhlet-Henkeli je službena titracijska metoda za određivanje stupnja kiselosti mlijeka i mliječnih proizvoda. Princip metode bazira se na titraciji mlijeka 0,25 M natrijevom lužinom, a rezultati se izražavaju u stupnjevima po Soxhlet-Henkeli ($^{\circ}\text{SH}$) koji odgovaraju broju mililitara NaOH utrošenih za neutralizaciju 100 mL mlijeka uz indikator fenolftalein. Međutim, prema našem Pravilniku postoji modifikacija te metode i to: smjesa 20 mL mlijeka + 1 mL fenolftaleina se titrira s 0,1 mL NaOH do crvenkaste boje koja je stabilna 1 minutu. Kiselost se izračuna prema formuli:

$$[1] \quad \text{mL NaOH} \times 2 \times f = ^{\circ}\text{SH}$$

gdje je $a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$ utrošenih za neutralizaciju 20 mL mlijeka, a $f = \text{faktor otopine natrijeve lužine (NaOH)} = 0,1 \text{ mol/L} = 1$.

Potrebni pribor:

- Bireta za lužinu od 50 ml (s podjelom na 0,1 ili na 0,05 mL)
- 2 Erlenmeyerove tikvice od 100 mL
- 2 pipete od 20 mL
- 2 pipete od 1 mL
- Termometar
- Plamenik

Potrebni reagensi:

- 0,1 M otopina NaOH
- 2%-tna alkoholna otopina fenolftaleina
- 5%-tna otopina kobaltovog sulfata ($\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)

Priprema otopine kobaltovog sulfata:

U odmjernoj tikvici od 100 mL se otopi 5 g $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u destiliranoj vodi i nadopuni do oznake.

Postupak rada:

U jednu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 20 mL analiziranog mlijeka i doda 0,4 mL 5%-tne otopine kobaltovog sulfata. Time se dobiva standardna boja koja predstavlja nijansu do koje je mlijeko potrebno titrirati natrijevom lužinom. U drugu Erlenmeyerovu tikvicu otpipetira se 20 mL mlijeka prethodno temperiranog na 20°C i 1 mL 2%-tne otopine fenolftaleina. Smjesa se promiješa i titrira 0,1 M natrijevom lužinom do postizanja blijedo ružičaste boje koja se uspoređuje sa standardnom bojom i mora trajati 1 minutu (Božanić i sur., 2010).

3.2.3. Određivanje udjela mliječne masti u mlijeku butirometrijskom metodom prema Gerberu

Princip:

Metoda se zasniva na kemijskom otapanju proteina mlijeka (kazeina) i zaštitne opne globula mliječne masti sumpornom kiselinom. Radi lakšeg izdvajanja masti dodaje se izoamilni alkohol koji snizuje površinsku napetost mlijeka. Mast se odvoji centrifugiranjem i količina se očita pri točno određenoj temperaturi (65°C).

Potreban pribor:

- umjereni butirometar za mlijeko
- čep za butirometar
- nastavak za umetanje čepa u butirometar
- stalak za butirometre
- centrifuga po Gerberu, Nova Safety, proizvođač Funke-Gerber (Slika 6)
- vodena kupelj podešena na 65°C (ukoliko centrifuga nije temperirana)
- pipeta od 11 mL za mlijeko
- pipeta od 10 mL za sumpornu kiselinu
- pipeta od 1 mL za izoamilni alkohol

Potrebni reagensi:

- koncentrirana sumporna kiselina (Gerberova; $\varphi = 1,815-1,820$)
- izoamilni alkohol (za analize mlijeka i mliječnih proizvoda)

Postupak rada:

U butirometar se prvo otpipetira sumporna kiselina, zatim mlijeko i na kraju izoamilni alkohol. Mlijeko se u butirometar pušta tako da mlaz mlijeka ne udara izravno u sumpornu kiselinu, nego u stjenku butirometra iznad sloja sumporne kiseline jer bi u protivnom došlo do karbonizacije mliječnog šećera i proteina te stvaranja tamnog prstena koji bi otežavao očitavanje butirometra i mogao dati netočan rezultat. Mlijeko se u dodiru sa sumpornom kiselinom grušava i tako načini čvršći sloj na koji se zatim može brže pustiti ostala količina mlijeka. Nakon vađenja pipete u njezinom vrhu ostaje neznatna količina mlijeka koja se ne smije ispuhivati u butirometar jer je uzeta u obzir prilikom njegovog baždarenja. U pravilno napunjenom butirometru raspoznaju se tri oštro odijeljena sloja reagensa i mlijeka koji su očuvali svoju izvornu boju. Butirometar se zatvori čepom i promućka. Tijekom mućkanja svijetlosmeđa boja sadržaja butirometra postupno prelazi u tamnosmeđu, što je znak završetka reakcije i mućkanja. Zatim slijedi postupak centrifugiranja 5-10 minuta pri brzini od 1100-1200 o/min. Udio mliječne masti u mlijeku očitava se nakon sigurnog zagrijavanja sadržaja butirometra na $65 \pm 2^\circ\text{C}$. U tu svrhu, ukoliko centrifuga nije temperirana na 65°C , butirometri se nakon centrifugiranja uranjaju u vodenu kupelj te se rezultati analiza očitavaju nakon 5-10 minuta. Dužina stupca masti u kapilari odgovara udjelu masti u mlijeku izraženom u masenim postocima. Tijekom očitavanja butirometar se okrene prema svjetlu, strogo okomito, tako da prvo donji, pa zatim gornji menisk stupca masti bude točno u visini oka (Sabadoš, 1996).



Slika 6. Centrifuga po Gerberu, Nova Safety, proizvođač Funke-Gerber (Anonymous 2, 2017)

3.2.4. Određivanje udjela suhe tvari u mlijeku

Ukupna suha tvar mlijeka je definirana kao masa koja ostane po završetku određenog postupka sušenja na konstantnoj temperaturi do konstantne mase, a izražava se kao maseni udio. Suha tvar čine svi sastojci mlijeka osim vode i plinova. Suha tvar varira kod raznih vrsta i pasmina, ali i kod iste životinje te za kravlje mlijeko iznosi od 11 do 14%. Mlijeko mora sadržavati minimalno 8,5% suhe tvari bez masti (Božanić i sur., 2010).

3.2.4.1. Direktna metoda za određivanje ukupne suhe tvari

Potreban pribor:

- Analitička vaga Tehnica, Železniki tip 2615
- Eksikator s učinkovitim sredstvom za izvlačenje vlage
- Posudice s ravnim dnom, visine 20 do 25 mm, promjera 50 do 75 mm, od odgovarajućeg materijala, s poklopcima koji dobro prijanjaju i lako se uklanjaju (obično Al-posudice)
- Kvarcni pijesak, Grammol, Zagreb
- Hvataljka za posudice
- Sušionik s temperaturom održavanom na $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ na cijelom radnom prostoru, Instrumentaria Zagreb, ST-01/02

Postupak rada:

U aluminijsku posudicu stavi se kvarcnog pijeska (tako da prekriva dno) i zajedno s poklopcem stavi se u sušionik jedno pokraj drugog na sušenje barem 30 min. Staviti poklopac na posudicu i odmah je premjestiti u eksikator te pustiti da se ohladi do sobne temperature (odnosno oko 30 min) i odvagati s točnošću od 0,1 mg. Odmah otpipetirati 10 mL uzorka, koji je prethodno temperiran na temperaturu 20-25°C te homogeniziran miješanjem, u pripremljenu posudicu. Zagrijavati posudicu, s poklopcem pored nje, u sušioniku 2 sata na konstantnoj temperaturi od $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Staviti poklopac na posudu, izvaditi je iz sušionika i ostaviti u eksikatoru da se ohladi do sobne temperature te ju izvagati s točnošću od 0,1 mg. Ponoviti postupak sušenja dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne prelazi 0,5 mg. Zabilježiti najnižu masu (Božanić i sur., 2010). Potom se vrši izračun udjela suhe tvari prema formuli:

$$[2] \quad \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari}$$



Slika 7. Određivanje udjela suhe tvari u sušioniku, Instrumentaria Zagreb, ST-01/02 (vlastita fotografija)

3.2.5. Određivanje pepela (udjela mineralnih tvari)

Princip metode je uparivanje mlijeka i mineralizacija na 550°C. Dodatkom octene kiseline olakšava se mineralizacija i vezivanje hlapivih sastojaka poput klora, fosfora i sumpora.

Potreban pribor:

- Peć za žarenje (Mufolna peć), Iskraterm, tip IP-08
- Sušionik (105°C)
- Porculanski lončići za žarenje
- Eksikator
- Plamenik
- Hvataljka
- Termometar
- Pipeta od 10 mL

Postupak rada:

Ižareni porculanski lončići u Mufovoj peći (Slika 8) pri temperaturi 650°C, ohlade se u eksikatoru, i u ohlađene lončiće važe se 10 mL mlijeka. Zatim se lončići stave na žarenje u Mufolnoj peć na temperaturu 550°C dok sadržaj ne pobijeli. Potom se lončići hlade u eksikatoru, važu i ponovo žare do konstantne mase te se izračuna postotak pepela u uzorku (Božanić i sur., 2010).

Račun:

$$[3] \quad \frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazan lončić}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ pepela}$$



Slika 8. Mufolna peč za žarenje, Iskraterm, tip IP-08 (vlastita fotografija)

3.2.6. Mikrobiološke analize mlijeka

S obzirom na to da mlijeko i mliječni proizvodi pripadaju grupi lako kvarljivih namirnica potrebno je provoditi mikrobiološke kontrole. Prvenstveno je potrebno osigurati kvalitetu i zdravstvenu ispravnost mliječnih proizvoda, a to je zakonski regulirano mikrobiološkim standardima za pojedinu grupu mliječnih proizvoda. Mikrobiološki standardi izražavaju broj mikroorganizama u 1 g ili 1 mL proizvoda. Pod brojem mikroorganizama podrazumijeva se broj kolonija na krutoj podlozi ili broj dobiven postupkom najvjerojatnijih brojeva.

Mikrobiološka analiza provodila se standardnom metodom, neizravno, određivanjem broja živih bakterija. Ovom metodom određuje se broj živih bakterija u mliječnim proizvodima, uz pretpostavku da se iz pojedine stanice na (ili u) čvrstom hranjivom supstratu u Petrijevim zdjelicama razvila po jedna odvojena kolonija. Ona se sastoji od mnoštva potomaka i ishodišne stanice ili skupine stanica.

U ovom istraživanju provodile su se mikrobiološke analize za sirovo mlijeko uzorkovano iz mljekomata kod kojeg se određivala prisutnost enterobakterija, kvasaca i plijesni te ukupnog broja bakterija.

3.2.6.1. Priprema hranjivih podloga

U današnje vrijeme najčešće se za mikrobiološke analize koriste dehidrirane podloge u prahu uz koje su priložene upute vezane uz pripremu i sterilizaciju istih.

Potrebni pribor:

- Laboratorijska vaga Technica, Železniki, Slovenija EB-1200C
- Erlenmeyerova tikvica za pripremu podloge (2000 mL)
- Električni grijač sa magnetskom miješalicom (Rotamix SHP-10, Mehtnica, Železniki, Slovenija)
- Magnet
- Boce (500 mL)
- Autoklav, Inako 1935 Zagreb, AV 300 ART

Priprema hranjive podloge za određivanje ukupnog broja mikroorganizama u mlijeku

Potrebni materijali:

- Dehidrirana hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja mikroorganizama Tryptic glucose yeast agar, Biolife, Italija
- Destilirana voda, PBF, Zagreb

Postupak:

Hranjiva podloga za određivanje ukupnog broja mikroorganizama pripremi se prema uputama proizvođača i to tako da se 23,5 g dehidrirane podloge u prahu otopi u 1000 mL hladne destilirane vode. Dehidrirana podloga se prvo pomiješa s otprilike polovicom volumena vode i snažno miješa kako bi se dobila homogena suspenzija, a potom se dodaje ostatak vode ispirući pritom ostatke podloge na stjenkama posude. Otopina se potom zagrijava na magnetskoj miješalici uz miješanje dok u potpunosti nestane sitnih čestica podloge. Prije sterilizacije pripremljena podloga se prelije u manje boce koje će se kasnije koristiti u analizama. Sterilizacija se odvija u autoklavu pri temperaturi od 121°C u trajanju 15-20 minuta, što ne uključuje vrijeme potrebno za zagrijavanje na radnu temperaturu.

Priprema hranjive podloge za određivanje prisutnosti kvasaca i plijesni

Potrebni materijali:

- Dehidrirana hranjiva podloga za određivanje kvasaca i plijesni Sabouraud dextrose agar CAF 50, Biolife, Italija
- Destilirana voda, PBF, Zagreb

Postupak:

Izvaže se 65 g dehidrirane hranjive podloge te se otopi u 1000 mL hladne destilirane vode. Daljnji postupak isti je kao i kod pripreme podloge za određivanje ukupnog broja mikroorganizama.

Priprema hranjive podloge za određivanje prisutnosti enterobakterija

Potrebni materijali:

- Dehidrirana hranjiva podloga za određivanje prisutnosti enterobakterija Violet red bile agar, Biolife, Italija
- Destilirana voda, PBF, Zagreb

Postupak:

41,5 g dehidrirane hranjive podloge otopi se u 1000 mL hladne destilirane vode. Pripremljena podloga zagrijava se na magnetskoj miješalici dok se u potpunosti ne suspendiraju sitne čestice podloge. Tako pripremljena podloga se ne autoklavira već se ohladi na 45-50°C nakon čega se u sterilnim uvjetima razlijeva u sterilne Petrijeve posudice (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.2. Priprema fiziološke otopine za decimalna razrjeđenja

Potrebni pribor:

- Laboratorijska vaga Technica, Železniki, Slovenija EB-1200C
- Erlenmeyerova tikvica (1000 mL ili 2000 ml) za pripremu fiziološke otopine
- Epruvete
- Čepovi za epruvete
- Akupenser
- Autoklav Inako 1935 Zagreb, AV 300 ART

Potrebni reagensi:

- NaCl
- Destilirana voda, PBF Zagreb

Pripremi se 0,9 %-tna otopina NaCl tako da se 9 g natrijevog klorida otopi u 1000 mL destilirane vode. Pripremljena fiziološka otopina pomoću akupensera se raspodijeli u epruvete tako da se u svaku epruvetu stavi 9 mL otopine. Epruvete se začepi i stavi u košaru za sterilizaciju te se sterilizira u autoklavu (Inako 1935 Zagreb, AV 300 ART) pri 121°C, 20 minuta (Božanić i sur., 2010).

3.2.6.3. Sterilizacija posuda

Posuđe koje se koristi (pipete, Petrijeve ploče, Erlenmeyerove tikvice i sl.) sterilizira se postupkom suhe sterilizacije u sušioniku (Uniblok 3U1, Inko, Zagreb). Posuđe i pribor prethodno se zamota u papir kako bi se spriječila rekontaminacija nakon završetka sterilizacije. Za kontrolu uspješnosti sterilizacije koriste se indikatorske trake koje promijene boju tijekom sterilizacije i na taj način ukazuju na završetak sterilizacije.

3.2.6.4. Priprema decimalnih razrjeđenja

Potrebni pribor:

- Mikropipeta (10-1000 μL)
- Sterilni nastavci za mikropipetu
- Vorteks mješač

Iz homogeniziranog uzorka mlijeka sterilnom mikropipetom 1 mL uzorka prenese se u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nastalo razrjeđenje dobro se homogenizira na vorteks mješaču te se iz te epruvete, čistim sterilnim nastavkom za mikropipetu 1 mL homogeniziranog razrjeđenja prenese u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Postupak se ponavlja dok se ne dobije željeni broj decimalnih razrjeđenja (Slika 9).



Slika 9. Priprema decimalnih razrjeđenja (vlastita fotografija)

3.2.6.5. Nacjepljivanje i inkubacija zdjelica

Potrebni pribor:

- Mikropipteta (10-1000 μ L)
- Sterilni nastavci za mikropipetu
- Plamenik
- Petrijeve ploče
- Štapić po Drygalskom
- Vorteks mješač
- Vodena kupelj

Potrebni reagensi:

1. Alkohol (96-98%)

Mikropipetom se uzme 1 mL decimalnog razrjeđenja uzorka i otpusti u prethodno označenu, sterilnu Petrijevu ploču. Od svakog razrjeđenja pripremaju se dvije paralele. Nakon pipetiranja razrjeđenja na Petrijeve ploče, u svaku ploču dolijeva se 10-12 mL hranjivog supstrata (agara), prethodno rastopljenog u vodenoj kupelji zagrijanoj na 100°C te zatim ohlađenog i držanog u vodenoj kupelji na 43-45°C. Odmah nakon nalijevanja agara on se jednolično promiješa blagim, kružnim kretanjem i slabim nagibanjem zatvorene ploče. Sve se radi u sterilnim uvjetima uz dva plamenika kako ne bi došlo do kontaminacija zdjelica.

Za određivanje enterobakterija u mlijeku, nacjepljuje se 100 μ L uzorka na Petrijevu ploču te se štapićem po Drygalskom kružnim pokretima razmaže po površini podloge. Štapić po Drygalskom prethodno se sterilizira u alkoholu i na plameniku.

Petrijeve ploče polože se na vodoravnu podlogu i puste da stoje otprilike 15 minuta dok se podloga potpuno ne skrutne. Zatim se ploče okrenu dnom prema gore, a poklopcem prema dolje kako bi se spriječila kondenzacija isparene vode na agaru. Ploče se stavljaju u termostat, pojedinačno ili jednu na drugu. Uobičajeno, inkubacija pri stalnoj temperaturi od 30°C traje 72 sata dok je za razmnožavanje kvasaca i plijesni optimalna niža temperatura pa se inkubacija nacjepljenih podloga provodi na sobnoj temperaturi u trajanju od 3 do 5 dana.

3.2.6.6. Očitavanje rezultata

Potrebni pribor:

1. Brojač kolonija s povećalom

Nakon inkubacije u termostatu, treba izbrojati narasle kolonije. Tijekom brojanja ploče se drže na tamnoj podlozi ili na brojaču kolonija (Slika 10). Za brojanje se odabiru ploče na kojima je naraslo između 30 i 300 kolonija pri čemu se broj kolonija na paralelnim zdjelicama (isti uzorak, isto razrjeđenje) ne smije razlikovati za više od $\pm 10\%$. Na kraju se izračuna aritmetička sredina broja naraslih kolonija i pomnoži s faktorom razrjeđenja te se na taj način dobije broj mikroorganizama u 1 mL mlijeka.

$$[4] \quad \text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$$



Slika 10. Brojač kolonija, Funke Gerber – Colonystar bacteria counter (Anonymus 3, 2016)

3.2.7. Instrumentalna metoda analize – MilkoScan FT1

Ispitivanje kemijskog sastava provodi se infracrvenom spektrofotometrijom (IR) sukladno normi HRN ISO 9622:2001 na uređaju MilkoScan™ FT1 (HPA, 2016). Analiza je provedena u Dukat d.d. mljekarskoj industriji. Uređaj pruža do 120 pouzdanih mjerenja po satu. MilkoScan omogućuje brzu analizu kemijskih parametara poput mliječne masti, proteina, laktoze, suhe tvari i suhe tvari bez masti. Rezultati su vrlo precizni i odmah se pohranjuju u računalo radi sljedivosti. Uređaj ima funkciju samo održavanja/čišćenja nakon analize. Široki radni raspon temperatura (5-55°C) omogućuje izravnu analizu čak i hladnih, ali homogenih uzoraka.

3.2.8. Instrumentalna metoda analize – Fossomatic Minor

Brojanje somatskih stanica provodi se Fluoro-opto-elektronskom metodom sukladno HRN ISO 13366-2:2007 (HPA, 2016). Za potrebe ovog istraživanja korišten je Fossomatic™ Minor (Slika 11), proizvođača FOSS, Danska. Analiza je provedena u Dukat d.d. mljekarskoj industriji. Ovaj uređaj dizajniran je za potrebe manjih laboratorija pa i za mljekare koji žele provoditi vlastita testiranja. Uređaj je dizajniran kako bi se smanjila upotreba reagensa pa tako i uzoraka. Za potrebe analize dovoljan je 1 mL uzorka temperiran na 30 - 42°C. Fossomatic Minor obrađuje prosječno 50 uzoraka/h a u mogućnosti je izmjeriti do 5 000 000 somatskih stanica/mL. Jednostavan je za korištenje, postavljanje i održavanje.



Slika 11. Uređaji MilkoScan™ FT1 (lijevo) i Fossomatic™ Minor (desno) za instrumentalne metode analiza, proizvođača FOSS, Danska (Anonymous 4)

3.2.9. Statistička analiza

Matematičko-statistička analiza podataka (parametri deskriptivne statistike) provedena je u statističkom programu SPSS (v20) te u MS Excel-u 2013. Izračunata je srednja vrijednost (\bar{X}) za sve uzorke koji su kao takvi prikazani u rezultatima. Standardna devijacija (δ), te minimalna (Min.) i maksimalna (Max.) vrijednost izračunate su za određene kemijske parametre. Vrijednosti broja mikroorganizama u mlijeku izražene su kao logaritamske vrijednosti log CFU/mL.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Unazad nekoliko godina u RH se mlijeko uspješno prodaje putem mljekomata. Općenito je poznato da je mlijeko lako kvarljiva namirnica, zato je vrlo bitno provoditi redovne analize kako bi potrošači bili sigurni da kupuju zdravstveno ispravno mlijeko, odnosno da ne kupuju. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati mikrobiološku te fizikalno-kemijsku kvalitetu sirovog mlijeka s mljekomata te uvidjeti razlike u sastavu mlijeka tijekom zimskog i ljetnog razdoblja. U konačnici na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti odgovara li kemijska i higijenska kvaliteta mlijeka s mljekomata uvjetima propisanim Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17).

Ovo poglavlje podijeljeno je u dva podpoglavlja u kojima su prikazani rezultati fizikalno - kemijskih te mikrobioloških analiza svježeg sirovog mlijeka s 11 različitih mljekomata. Svi rezultati izraženi su kao srednje vrijednosti.

Rezultati određivanja kiselosti sirovog mlijeka iz mljekomata mjerenjem pH i titracijskom metodom po Soxhlet-Henklu prikazani su u tablici 5.

Tablica 6 prikazuje rezultate analiza kemijskih parametara mlijeka prikupljenih u zimskom i ljetnom periodu. Tablica 7 prikaz je rezultata određivanja udjela proteina i laktoze na uređaju MilkoScan uz navedena odstupanja. Na slici 12 grafički je prikaz prosječnog udjela suhe tvari u uzorcima mlijeka s mljekomata prikupljenih u zimskom i ljetnom razdoblju. Slika 13 grafički prikazuje prosječan udio mliječne masti određene na uređaju MilkoScan u uzorcima mlijeka s mljekomata.

U tablici 8 prikazane su prosječne vrijednosti dobivene nakon mikrobiološkog ispitivanja sirovog mlijeka. Na slici 14 nalazi se pivot grafikon rezultata mikrobiološkog ispitivanja sirovog mlijeka. Vrijednosti su logaritmizirane i prikazane kao log CFU/mL radi ravnomjerne raspodjele vrijednosti.

Tablica 9 prikazuje prosječne vrijednosti određivanja broja somatskih stanica u sirovom mlijeku koji su grafički prikazani na slikama 15 i 16. Slika 17 prikazuje promjenu udjela mliječne masti, proteina i laktoze ovisno o BSS u uzorcima sirovog mlijeka prikupljenih u zimskom razdoblju.

4.1. Fizikalno - kemijske analize mlijeka

Odmah nakon dopremanja uzoraka sirovog mlijeka u laboratorij provedene su kemijske analize, odnosno prvenstveno je određena svježina mlijeka, određivanjem aktivne i titracijske kiselosti.

Tablica 5. pH-vrijednost i titracijska kiselost (°SH) mlijeka

<i>Uzorak</i>	<i>pH-vrijednost</i>		<i>titracijska kiselost (°SH)</i>	
	<i>zima</i> \bar{X}	<i>ljet</i> \bar{X}	<i>zima</i> \bar{X}	<i>ljet</i> \bar{X}
<i>1</i>	6,67	6,66	8,5	8,5
<i>2</i>	6,67	6,67	9,3	9,3
<i>3</i>	6,81	6,80	10,83	10,25
<i>4</i>	6,67	6,77	8,65	9,05
<i>5</i>	6,79	6,79	9,43	8,95
<i>6</i>	6,78	-	10,23	-
<i>7</i>	6,80	6,80	9,6	9,05
<i>8</i>	6,78	6,76	10,6	10,0
<i>9</i>	6,77	6,77	10,83	10,9
<i>10</i>	6,77	6,78	9,9	9,75
<i>11</i>	6,75	6,73	10,65	10,75

\bar{X} - aritmetička sredina

Kao što je vidljivo u tablici 5, pH vrijednost kretala se u rasponu od 6,66 do 6,81. Najveća pH vrijednost određena je u uzorku 3, a najmanja u uzorku 1. Dobivene vrijednosti malo su izvan granica koje propisuje Pravilnik (6,5 - 6,7) međutim one su i dalje u rasponu definiranom za normalnu, prihvatljivu, nativnu ili primarnu kiselost sirovog mlijeka. Ona potječe od kiselih svojstava kazeina, fosfata, citrata, askorbinske kiseline, nešto CO₂ te slobodnih aminokiselina i masnih kiselina (Tratnik i Božanić, 2012). Tremonte i sur. (2014) u svom istraživanju provedenom u Italiji zabilježili su pH vrijednost sirovog mlijeka koja se kretala oko $6,72 \pm 0,06$, dakle slično kao i u ovom radu.

Određena odstupanja su zabilježena kod određivanja titracijske kiselosti sirovog mlijeka za koju su dopuštene granice od 6,6, do 6,8°SH.

U ovom istraživanju stupanj kiselosti mlijeka kreće se od 8,50 do 10,83°SH, gdje najveću kiselost imaju uzorci 3 i 9, a najmanju uzorak 1. Slične rezultate pokazuje i istraživanje HAH (2016) gdje je prosječna titracijska kiselost iznosila 8,62°SH uz maksimalnu izmjerenu vrijednost od čak 15,00°SH, dok je minimalna izmjerena vrijednost bila 8,25°SH. Razlog nešto većih vrijednosti titracijske kiselosti vjerojatno leži u puferskom kapacitetu samog mlijeka koji potječe od proteina kazeina te topljivih fosfata i citrata. U prilog tome ide nešto veći udio proteina u uzorku 3, odnosno nešto manji udio u uzorku 1. Naime, za neutralizaciju tih sastojaka mlijeka potrebno je utrošiti više lužine NaOH. Iz tog razloga aktivna kiselost ne može biti u korelaciji s titracijskom kiselosti. pH vrijednost mlijeka je kiselost uzrokovana koncentracijom vodikovih iona i naziva se aktivnom kiselošću, za razliku od potencijalne kiselosti uvjetovane od svih drugih sastojaka koji se tretiraju lužinom. Međutim i mikroorganizmi su ti koji mogu uzrokovati povišenu titracijsku kiselost sirovog mlijeka. Djelovanjem mikroorganizama dolazi do fermentacije laktoze u mliječnu i druge kiseline te nastaje tzv. stvorena ili sekundarna kiselost. Samim time količina nastale mliječne kiseline indirektno ukazuje na broj mikroorganizama u mlijeku te se povećanje stupnja kiselosti iznad normalnih vrijednosti za sirovo mlijeko smatra posljedicom razmnožavanja mikroorganizama u mlijeku. Obzirom da je svim uzorcima mlijeka određen visoki ukupni broj mikroorganizama, a vrijednosti titracijske kiselosti su iznad prosjeka, može se pretpostaviti da su ova dva čimbenika međusobno povezana. U pravilu ne bi trebala postojati razlika u kiselosti u uzorcima prikupljenim zimi i ljeti. pH vrijednost je konstantna tijekom uzorkovanja i ne mijenja se u odnosu na godišnje doba. Premda vrijednosti titracijske kiselosti određene u ljetnom uzorkovanju ipak malo odstupaju od onih zimskih. Međutim u literaturi ne postoji opravdani razlog kojim bi se ta činjenica mogla potkrijepiti, stoga ta odstupanja možemo pripisati eventualnim pogreškama pri uzorkovanju ili samoj provedbi metode određivanja kiselosti.

Mliječna mast

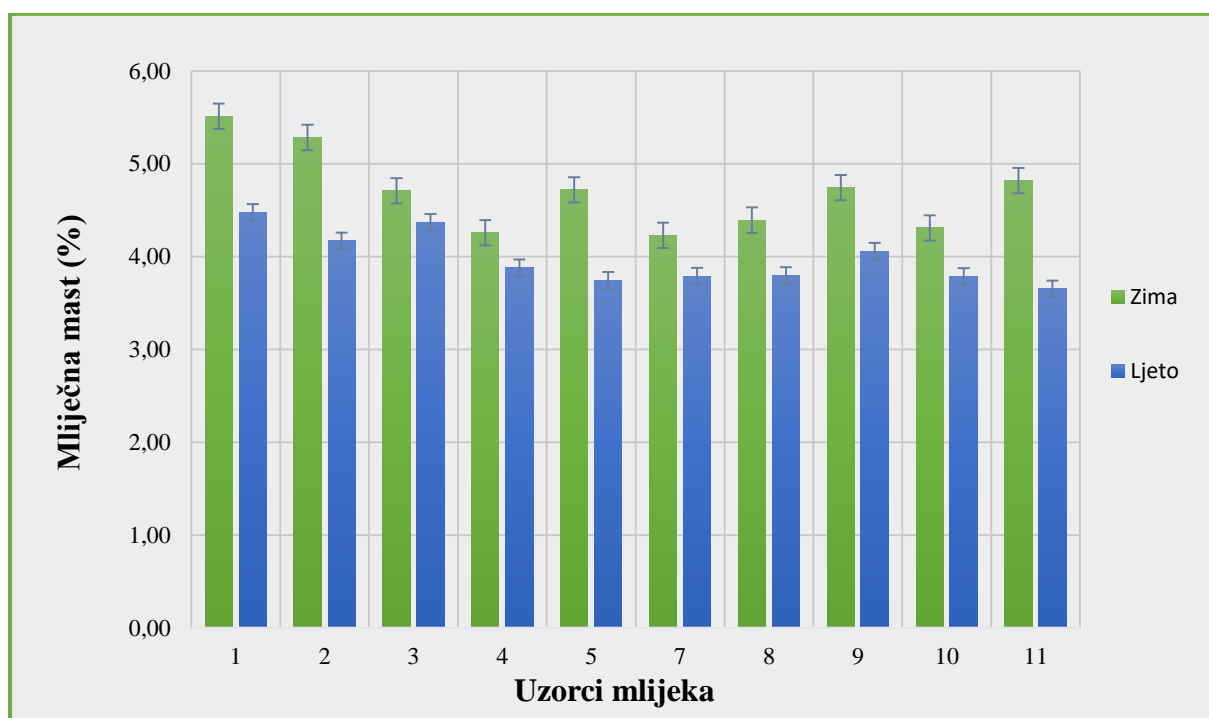
U tablici 6 prikazane su prosječne vrijednosti analize kemijskih parametara uz prosječnu vrijednost svih uzoraka po kemijskom parametru. Mliječna mast je količinski najpromjenjiviji sastojak mlijeka, najveće energetske vrijednosti te o postotku masti ovisi energetska i hranidbena vrijednost mlijeka. Posebice je mliječna mast značajna za ljudsku prehranu radi sadržaja esencijalnih masnih kiselina (linolne, linolenske i arahidonske), kao i sadržaja vitamina topivih u mastima (A, D, i E) koji su u mlijeku češće nazočni kao provitamini (Jensen, 2002).

Tablica 6. Rezultati određivanja kemijskih parametara mlijeka u zimskom (n=3) i ljetnom periodu (n=2)

Uzorak	Proteini (g/100g)		Laktoza (g/100g)		Mliječna mast (g/100g)		Bezmasna suha tvar (g/100g)		Suha tvar (g/100g)		Pepeo (g/100g)	
	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto
1	3,27	3,37	4,52	4,60	5,51	4,48	8,61	8,97	13,60	13,03	0,71	0,71
2	2,98	3,24	4,27	4,52	5,28	4,17	8,21	8,74	11,84	12,22	0,69	0,68
3	3,83	3,58	4,53	4,63	4,71	4,37	9,34	9,20	13,64	12,87	0,74	0,73
4	3,61	3,57	4,55	4,60	4,26	3,88	9,17	9,16	13,04	11,79	0,74	0,73
5	3,57	3,31	4,37	4,40	4,72	3,75	8,55	8,70	12,53	11,99	0,69	0,71
6	3,49	-	4,61	-	3,76	-	9,06	-	12,49	-	0,73	-
7	4,01	3,32	4,35	4,41	4,23	3,79	8,61	8,72	12,66	12,14	0,71	0,70
8	3,44	3,22	4,74	4,66	4,39	3,80	9,16	8,80	13,23	12,37	0,71	0,71
9	3,31	3,21	4,66	4,70	4,74	4,06	8,93	8,89	13,25	12,62	0,72	0,71
10	3,30	3,16	4,25	4,34	4,31	3,79	8,61	8,49	12,54	11,95	0,71	0,70
11	3,55	3,45	4,54	4,59	4,82	3,65	8,72	9,03	13,21	12,29	0,74	0,74
\bar{X}	3,49	3,34	4,49	4,54	4,61	3,97	8,82	8,87	12,91	12,32	0,72	0,71

\bar{X} - aritmetička sredina

Rizik od štetnog utjecaja mliječne masti na zdravlje postoji samo kod pretjeranog unosa životinjskih masti (HAH, 2016). Stoga je mliječna mast prvi pokazatelj kakvoće i cijene mlijeka. Režim hranidbe krava i vrste krmiva imaju veliki utjecaj na masnoću mlijeka (Feldhofer i sur., 1999). Može se reći kako na količinu i sastav mliječne masti u mlijeku utječu: genetika odnosno pasmina krave, njen stupanj laktacije, eventualne infekcije vimena, prehrana (sezonski i regionalni učinci, vrsta žitarica, lijekovi, suplementacija) te sezona. Minimalna vrijednost mliječne masti koju proizvođači prema Pravilniku moraju zadovoljiti iznosi 3,2%. Najveći prosječni udio mliječne masti određen je za vrijeme zimskog uzorkovanja u uzorku 1 i iznosio je 5,51%. Najmanji prosječni udio dobiven je kod uzorka 5 u ljetnom uzorkovanju te je iznosio 3,75%. Svi uzorci prikupljeni zimi pokazuju veći udio mliječne masti od onih uzorkovanih ljeti što se najbolje vidi grafički prikazano na slici 12.



Slika 12. Prosječan udio mliječne masti određen MilkoScanom (%) u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata zimi i ljeti

Prosječno je udio mliječne masti zimi iznosio 4,61% a ljeti 3,97%. Claeyss i sur. (2013) u preglednom radu navode raspon kretanja mliječne masti 3,3 - 5,4% što se poklapa s ovim istraživanjem, osim što je kod njih zabilježena ekstremno niska minimalna vrijednost (1,20%). Naime, povišene temperature okoliša ($>24^{\circ}\text{C}$) pogotovo ako su povezane s visokom vlažnošću zraka ($>90\%$) utječu na pojavu stresa u mliječnim krava. Posljedično tome krave unose manje suhe tvari što se negativno odražava na proizvodne pokazatelje.

Prema tome, udio mliječne masti i proteina u pravilu je najveći u zimskom i jesenskom periodu budući da krave imaju povećani apetit u hladnijim razdobljima (Konjačić i sur., 2015).

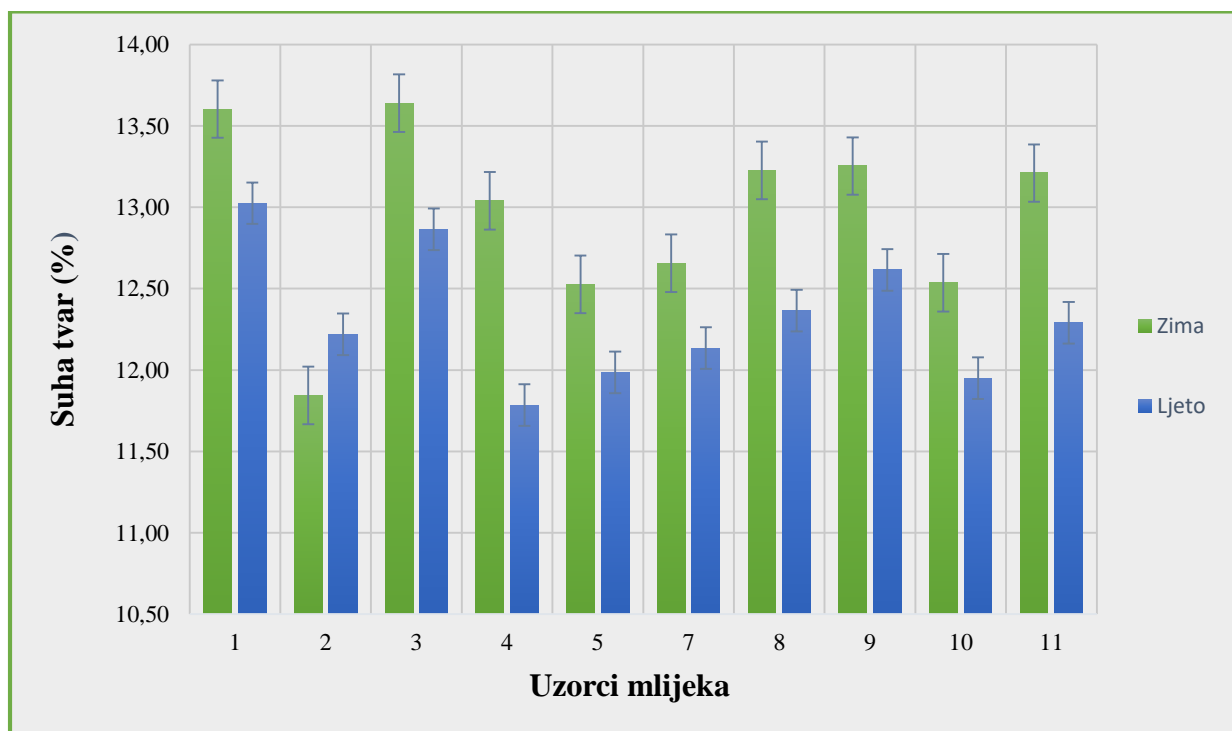
Bezmasna suha tvar

Bezmasna suha tvar je kemijski parametar koji ovisi o sadržaju proteina, laktoze i mineralnih tvari. U normalnim uvjetima količina suhe tvari bez masti rijetko pada ispod 8,5%. Na količinu najviše utječe količina proteina u mlijeku. Suha tvar bez masti smanjuje se i patvorenjem mlijeka - dodavanjem vode. Ovim načinom patvorenja sadržaj se suhe tvari spušta ispod 8,5%, što je minimum propisan Pravilnikom o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17). Mlijeko koje sadrži više od 10% suhe tvari bez masti također je sumnjivo na patvorenje (HPA, 2008). Patvorenje razvodnjavanjem proizvođačima je vrlo privlačan način ostvarenja materijalne dobiti jer i minimalnim dodavanjem vode u mlijeko, njihov je profit veći. Danas je taj način prevare reguliran već na ulazu mlijeka u mljekaru, gdje se u laboratoriju kontrolira točka ledišta te se provodi tzv. test alkoholne probe, s 72%-tnim alkoholom. Mlijeko koje ne zadovoljava kriterije propisane Pravilnikom, ne zaprima se. U slučaju da je mlijeko patvoreno razvodnjavanjem, udio bezmasne suhe tvari bio bi manji od propisanog. Najmanja prosječna vrijednost bezmasne suhe tvari određena je u uzorku 2 u zimskom uzorkovanju i iznosila je 8,21%. U uzorku 3 određena je najveća prosječna vrijednost i to u ljetnom uzorkovanju. Prosječno je vrijednost bezmasne suhe tvar iznosila 8,82% za zimski period te 8,87% za ljetni. Slične vrijednosti Konjačić i sur. (2015) navode u svom radu, gdje prosječna vrijednost suhe tvari bez masti iznosi 8,87%.

Suha tvar

Suhu tvar mlijeka čine svi sastojci mlijeka osim vode i plinova (Božanić i sur., 2010). Doda li se bezmasnoj suhoj tvari mliječnu mast, otprilike se dobije vrijednost suhe tvari koja se nalazi u mlijeku u udjelu od 11% do 14%. Suha tvar u mlijeku varira zbog različitih čimbenika kao što su pasmina i zdravstveno stanje životinja, način i vrsta hranidbe, stadij laktacije, sezona, način mužnje (ručno ili strojno), i broj mužnje, a ponajviše o samom individuumu (tjelesna masa, kretanje, dob i slično). Ona u mlijeku označava skupni naziv važnih hranjivih sastojaka potreban za rast i razvoj ljudskog organizma. Ti sastojci su laktoza, mliječna mast, proteini i neproteinski dušik (mali peptidi, slobodne aminokiseline, aminošećeri, kreatin, urea, ureinska kiselina i druge) (Havranek i Rupić, 2003).

Maksimalna prosječna određena vrijednost suhe tvari iznosila je u uzorku 1 - 13,60% za vrijeme zimskog uzorkovanja. Najmanji udio suhe tvari određen je u uzorku 4, za vrijeme ljetnog uzorkovanja i iznosio je 11,79%. Bašić i sur. (2012) određivali su kemijsku i higijensku kvalitetu mlijeka na farmama mliječnih krava u tri hrvatske regije. U svom radu su za središnju regiju odredili udio suhe tvari koji je iznosio $12,91 \pm 0,04$ za mala gospodarstva te $13,09 \pm 0,09$ za velika gospodarstva. Obje vrijednosti potvrđuju rezultate ovog istraživanja. Bašić i sur. (2012) također navode kako su mnogi autori istraživali prosječne vrijednosti suhe tvari u mlijeku pojedinih pasmina goveda. Tako su Dozet i sur. (1976) utvrdili u mlijeku šest pasmina slijedeći udio suhe tvari: buša (13,30%), simentalac (13,07%), holstein (12,98%), sivo tirolsko (12,69%), pincgavac (12,64%) i smeđe alpsko (12,62%). Godišnja proizvodnja mlijeka, kao i udio suhe tvari, ovisi o pasminama krava. Visoku godišnju laktaciju imaju specijalizirane mliječne pasmine holstein frisien (Bosnić, 2003). Na području središnje Hrvatske ali i na razini cijele države, najviše se uzgaja simentalac (oko 70%) koja je najpoznatija kombinirana pasmina na svijetu te holstein (istočno - frizijska), najmlječnija pasmina goveda. Prema Dozet i sur. (1976) upravo simentalac daje mlijeko koje sadrži u prosjeku 13,07% suhe tvari što je slično rezultatima ovog istraživanja. Bobić i sur. (2014) u svom istraživanju zaključili su kako holstein pasmine daju znatno veću količinu mlijeka po mužnji u odnosu na simentalac dok mužnja kod simentalke pasmine traje duže. Udio suhe tvari ljeti u svim je uzorcima mlijeka niži od onog zimi što odlično prikazuje slika 13.



Slika 13. Prosječan udio suhe tvari (%) u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata zimi i ljeti

Pepeo

Udio mineralnih tvari u mlijeku je od 0,6 do 0,8%. Mlijeko sadrži oko 40 različitih mineralnih tvari i to mikroelemenata, koji se nalaze u tragovima poput Zn, Fe, Cu, Si, I i drugi, te makroelemenata koji su organske i anorganske soli. Najveći udio mineralnih tvari u mlijeku čine soli kalcija i fosfora. Vitamini se u mlijeku nalaze u obliku topljivih u mastima (A, D, E, K) i topljivih u vodi (B kompleks, C) (Pavičić, 2006). Najmanja vrijednost pepela određena je u uzorku 2 i iznosila je 0,68%. Najveći udio pepela iznosio je 0,73%, a određen je u uzorku 5. Sezonski su razlike gotovo nikakve (0,72%/0,71%). Pepeo je uz laktozu najmanje varijabilan sastojak mlijeka.

Proteini

Tablica 7 prikazuje rezultate određivanja proteina i laktoze na uređaju MilkoScan. Najmanji prosječni udio proteina određen je u uzorku 2 i iznosio je 2,98% uz minimalno prosječno odstupanje. Najveći prosječni udio određen je u uzorku 7 i iznosio je 4,01% uz nešto veće odstupanje od 0,53%. Dakle, udio proteina u mlijeku kretao se između 2,98 i 4,01%, odnosno u prosjeku od 3,49%.

Tablica 7. Rezultati određivanja udjela proteina i laktoze na MilkoScan-u

Uzorak	Proteini (g/100g)		Laktoza (g/100g)	
	Zima	Ljeto	Zima	Ljeto
	$\bar{X} \pm \delta$ n = 3	$\bar{X} \pm \delta$ n = 2	$\bar{X} \pm \delta$ n = 3	$\bar{X} \pm \delta$ n = 2
1	3,27 ± 0,07	3,37 ± 0,04	4,52 ± 0,01	4,60 ± 0,01
2	2,98 ± 0,05	3,24 ± 0,18	4,27 ± 0,09	4,52 ± 0,16
3	3,83 ± 0,01	3,58 ± 0,04	4,53 ± 0,03	4,63 ± 0,05
4	3,61 ± 0,02	3,57 ± 0,01	4,55 ± 0,02	4,60 ± 0,01
5	3,57 ± 0,58	3,31 ± 0,01	4,37 ± 0,07	4,40 ± 0,04
6	3,49 ± 0,03	-	4,61 ± 0,01	-
7	4,01 ± 0,53	3,32 ± 0,03	4,35 ± 0,05	4,41 ± 0,06
8	3,44 ± 0,11	3,22 ± 0,01	4,74 ± 0,03	4,66 ± 0,03
9	3,31 ± 0,03	3,21 ± 0,01	4,66 ± 0,05	4,70 ± 0,03
10	3,30 ± 0,10	3,16 ± 0,00	4,25 ± 0,02	4,34 ± 0,01
11	3,55 ± 0,02	3,45 ± 0,00	4,54 ± 0,03	4,59 ± 0,04

δ - standardna devijacija, \bar{X} - aritmetička sredina

Ovakvi rezultati u okviru su Pravilnika koji propisuje minimalnu vrijednost od 3,0%. Štetca i sur. (2014) dobili su prosječnu vrijednost proteina u mlijeku 3,10% (2,82-3,30%), a prema Bendelja i sur. (2011) prosječna količina proteina u mlijeku iznosila je 3,5%, što je sličnije rezultatima ovog istraživanja. Uremović i sur. (2002) ustanovili su kako na udio proteina u mlijeku utječe i dodatak koncentrata u obroku krava. Uglavnom su veće vrijednosti proteina, (osim u uzorcima 1 i 2) izmjerene u zimskom uzorkovanju što se kao i kod mliječne masti može pripisati prehrani krava koja je u korelaciji sa sezonom. Međutim, za razliku od udjela mliječne masti koja je varijabilna i relativno brzo se može povećati, udio proteina raste sporije. Tome je vjerojatno uzrok činjenica da na udio proteina utječe genotip, odnosno pasmina i da se sporije mijenja pod utjecajem negenetskih čimbenika kao što je sezona (Bašić i sur., 2012).

Laktoza

Prosječan udio laktoze se u uzorcima kretao u rasponu od 4,25% do 4,70% uz minimalna odstupanja od 0,03% gdje je najveća vrijednost utvrđena u uzorku 9, a najmanja u uzorku 10. Naime, radi se o sastojku mlijeka koji u svježem sirovom kravljem mlijeku najmanje varira osim ako se radi o kraju razdoblja laktacije ili o mlijeku mastitične životinje. Tada može doći do smanjenja količine laktoze za 10-20%. Smatra se da mlijeko koje sadrži manje od 4,5% laktoze potječe iz bolesnog vimena, zahvaćenog upalnim procesom. Na taj način kroz mliječnu žlijezdu protječe manja količina krvi, a s njom i manja količina glukoze koja je jedan od prekursora u sintezi laktoze (Antunac i sur., 1997). Obzirom da je najveći broj somatskih stanica/mL utvrđen u uzorku 10 (932.916 BSS/mL) a najmanji udio laktoze (4,25%) također u tom uzorku, vrlo je vjerojatno kako to mlijeko potječe iz vimena mastitične krave. Prosječna vrijednost udjela laktoze u ovom istraživanju iznosi 4,54% što je nešto niže od vrijednosti koju je dobila HAH (2016) i u prosjeku iznosi 4,73%. Udio laktoze u prosjeku je za 0,5% veći u ljetnom razdoblju u odnosu na zimsko. Guetouache i sur. (2014) zaključuju kako koncentracija laktoze vrlo malo varira u mlijeku i kreće se u rasponu od 4,5-5,2%, te da na nju slabo utječe hranidba pa prema tome i godišnje doba te uvjeti držanja krava.

4.2. Mikrobiološke analize mlijeka

Osim fizikalno-kemijskih i higijenska svojstva sirovog mlijeka temeljni su pokazatelj njegove kakvoće, prikladnosti za preradu i zdravstvene ispravnosti. Stoga su mikrobiološke analize sastavni dio ispitivanja mlijeka i mliječnih prerađevina. Na rast i razvoj raznih patogena u sirovom mlijeku utječe velik broj čimbenika, poput veličine stada, higijene tijekom mužnje, zemljopisno područje i sezona ali i način uzorkovanja mlijeka (Kirin, 2001).

Bez obzira na sve ove utjecaje mlijeko može biti izvor patogena koji se prenose hranom i koji su značajni za ljudsko zdravlje (Oliver i sur., 2009). Osim što je veoma bitno proizvoditi higijenski ispravno mlijeko radi zdravlja ljudi, higijenska kakvoća sirovog mlijeka važna je i u izračunu njegove cijene, a to se neposredno tiče proizvođača i prerađivača mlijeka odnosno mljekara. Sirovo mlijeko, neposredno nakon dobro provedene mužnje nazivamo još i „aseptično“ mlijeko te ono uvijek sadrži manje od 5000 mikroorganizama/mL čiji broj može biti povećan uzročnicima mastitisa. Međutim, hlađenje mlijeka odmah nakon mužnje mijenja prirodno prisutnu mikrobnu populaciju, odnosno u neohlađenom mlijeku povećava se razina kontaminacije (Samaržija i sur., 2007., Tratnik i Božanić, 2012).

Iako, potencijalno patogeno, sirovo mlijeko s mljekomata zadržava sve karakteristike mlijeka kakvo jedna skupina potrošača želi kupovati. Takvo mlijeko je neobrano, nepasterizirano te prema opisima konzumenta zdravije, punijeg okusa te kvalitetnije. Ovi potonji često su i navedeni na mljekomatima („100% prirodno“; „Svježe, domaće, zdravo“). Motivi za kupovinu sirovog mlijeka su raznoliki ali jedan od najznačajnijih je da se kupovinom takvog mlijeka direktno podupire proizvođača (HAH, 2016).

Osim konzumenta proizvođače mlijeka podupire i država, ali na način da cijenu otkupa mlijeka određuje prema mikrobiološkom i kemijskom kriteriju. Ako mlijeko sadrži manje od 3,2% mliječne masti i 3,0% proteina, cijena mlijeku se umanjuje za 0,2363 kn/kg, a ako sadrži više od 4,3% mliječne masti i 4,0% proteina, obračunava se kao da ima 4,3% mliječne masti i 4,0% proteina. Prema tome, vrlo je bitno voditi računa o svim čimbenicima kvalitete mlijeka (kemijski sastav mlijeka, broj somatskih stanica i broj mikroorganizama) (HPA, 2008).

U tablici 8 prikazan je broj mikroorganizama u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata. Kao mjera higijenske kakvoće sirovog mlijeka, u mljekarskoj se praksi i u zakonskim propisima uzima ukupan broj mikroorganizama u 1 mL sirovog mlijeka (Kirin, 2001).

Tablica 8. Rezultati određivanja broja mikroorganizama (CFU/mL) u mlijeku

<i>Uzorak</i>	<i>ukupan broj MO (CFU/mL)</i>		<i>kvasci i plijesni (CFU/mL)</i>		<i>enterobakterije (CFU/mL)</i>	
	<i>zima</i>	<i>ljeto</i>	<i>zima</i>	<i>ljeto</i>	<i>zima</i>	<i>ljeto</i>
1	9,64 x 10 ⁶	2,82 x 10 ⁷	6,3 x 10 ³	1,71 x 10 ⁵	3,47 x 10 ³	4,26 x 10 ⁴
2	7,96 x 10 ⁶	2,75 x 10 ⁷	1,29 x 10 ⁵	4,1 x 10 ⁵	9,77 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴
3	1,46 x 10 ⁵	3 x 10 ⁷	2,8 x 10 ³	1,8 x 10 ³	1,33 x 10 ⁴	2,17 x 10 ⁵
4	1,23 x 10 ⁹	3,95 x 10 ⁷	9,34 x 10 ⁵	6,56 x 10 ⁵	1,14 x 10 ⁵	2,68 x 10 ⁵
5	1,40 x 10 ⁹	2,09 x 10 ⁸	1 x 10 ³	1,75 x 10 ³	1 x 10 ²	115
6	4,1 x 10 ⁶	-	4,94 x 10 ⁵	-	2,09 x 10 ⁴	-
7	2,92 x 10 ⁶	2,85 x 10 ⁶	6,8 x 10 ³	3,5 x 10 ²	3,05 x 10 ³	1,05 x 10 ⁴
8	1,23 x 10 ⁸	2,85 x 10 ⁸	3,76 x 10 ³	4,5 x 10 ²	6,99 x 10 ⁴	2,2 x 10 ³
9	7,96 x 10 ⁵	4,33 x 10 ⁸	1,35 x 10 ⁴	2,25 x 10 ⁴	1,52 x 10 ³	2,11 x 10 ⁴
10	1,28 x 10 ⁸	2,34 x 10 ⁷	1,58 x 10 ⁴	5,25 x 10 ³	2,48 x 10 ⁴	2,47 x 10 ⁵
11	9,7 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁷	6,33 x 10 ⁵	3,35 x 10 ⁴	4,72 x 10 ⁴	7,85 x 10 ⁴

Prema trenutno važećem Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17) mlijeko se razvrstava u dva razreda (I, II). Mikrobiološkom analizom sirovog mlijeka utvrđen je povećani broj mikroorganizama u svim uzorcima mlijeka. Odnosno niti jedan uzorak mlijeka ne odgovara nacionalnim propisima i standardima EU-a gdje je maksimalno dopušteni broj živih stanica bakterija u 1 mL sirovog mlijeka 100.000 (10⁵ CFU/mL). Najveći prosječni broj mikroorganizama sadržavao je uzorak 9 (4,33 x 10⁸ CFU/mL), prikupljen u ljetnom razdoblju a najmanji uzorak 3 (1,46 x 10⁵ CFU/mL) prikupljen u zimskom razdoblju. Prema tome, svi uzorci mlijeka mogu se svrstati u II razred (> od 400 000 CFU/mL). Ovako veliki ukupni broj mikroorganizama upućuje na lošu kvalitetu sirovog mlijeka, tj. upućuje na veliku kontaminaciju sirovog mlijeka. Do povećanja broja mikroorganizama dolazi ponajprije nakon mužnje, uslijed neadekvatnog čuvanja mlijeka te neadekvatnog održavanja muzne opreme i mljekomata.

U procesu mužnje i skladištenja mlijeka postoji nekoliko kritičnih točaka, potencijalnih izvora mikroorganizama, koje je potrebno uočiti i na njih pravovremeno i primjereno djelovati (Petrović i sur., 2006).

Očekivano, gotovo svi uzorci prikupljeni u ljetnom razdoblju (osim uzorka 7) sadrže veći broj mikroorganizama od onih prikupljenih u zimskom razdoblju. Razlog tomu su veće temperature koje pogoduju rastu i razmnožavanju raznih mikroorganizama pa su prema tome i veće vjerojatnosti za kontaminaciju mlijeka nakon mužnje ili putem mljekomata. Povećani broj bakterija u mlijeku ne mora nužno značiti da su one patogene, isto kao što ni mali broj bakterija ne mora značiti da one ne mogu djelovati štetno. Općenito je prihvaćeno mišljenje među stručnjacima da mlijeko s velikim brojem bakterija potječe iz oboljelog vimena ili da tijekom mužnje i rukovanja nisu poštivana pravila higijene. Međutim, kada se raspravlja o bakteriološkoj kvaliteti sirovog mlijeka, bitno je naglasiti da se pojam bakteriološke kvalitete ne smije promatrati u strogim okvirima određenog rezultata. Točnost rezultata određena je brojnim čimbenicima koji u većoj ili manjoj mjeri mogu utjecati na rezultat. Saznanja o karakteristikama pojedinih bakterijskih vrsta, njihovim međusobnim antagonističkim ili sinergističkim odnosima, djelovanju na mlijeko ili pojedine sastojke mlijeka, stalno se nadopunjuju, a ponekad i mijenjaju (Samaržija i sur., 2004).

Kalmus i sur. (2015) u svom istraživanju na sirovom mlijeku provedenom u Estoniji na 14 nasumično odabranih farmi, pronašli su široki raspon raznih mikroorganizama. 10 uzoraka, što čini 70% od ukupnog broja, sadržavalo je > 100.000 CFU/mL. Godić i sur., (2017) su tijekom svibnja, srpnja i rujna 2016. prikupljali uzorke mlijeka sa 17 različitih mljekomata diljem Slovenije. Ukupno su prikupili i analizirali 51 uzorak. Lokacija svih 17 mljekomata nije bila zadovoljavajuća, odnosno bila je olakšana kontaminacija okolinom budući da su se mnogi od njih nalazili na neprikladnim mjestima. To je bio slučaj i ovom istraživanju, gdje se većina mljekomata nalazila u blizini prometnica ili drugih izvora onečišćenja poput kontejnera, voćarni, drugih štandova. U ukupno 20 od 51 uzoraka pronađene su aerobne bakterije. Općenito nezadovoljstvo iskazuju zbog loše higijenske prakse proizvođača i nedovoljne edukacije potrošača o svježem sirovom mlijeku s mljekomata. U istraživanju Mikulec i sur., (2016) provedenom na uzorcima sirovog mlijeka s 28 mljekomata u RH, samo 29,1% analiziranih uzoraka sadržavalo je manje od 100.000 mikroorganizama/mL.

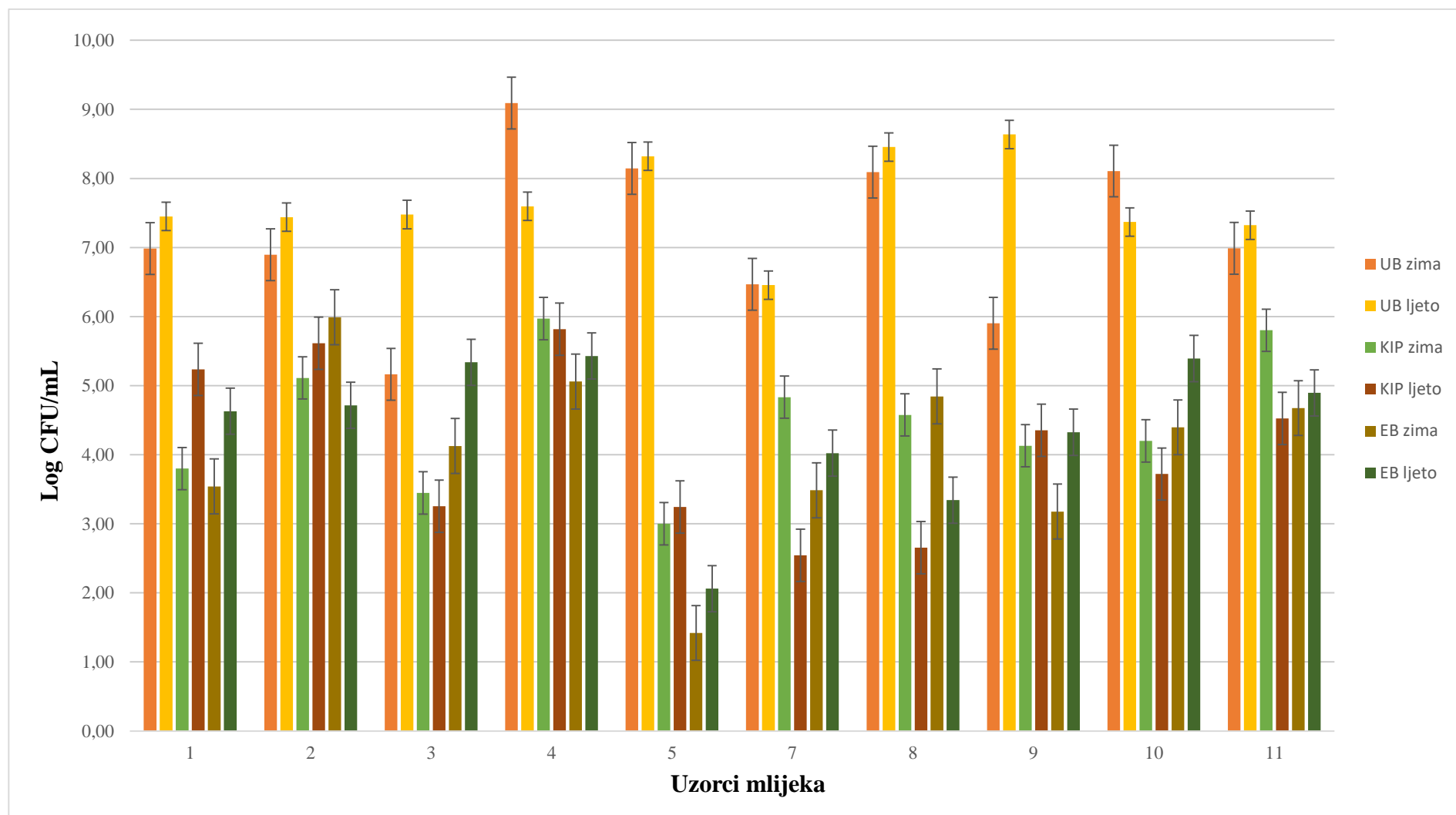
Određene vrijednosti za broj stanica kvasaca i plijesni bile su najveće u uzorku 4 ($9,34 \times 10^5$ CFU/mL) u zimskom i u ljetnom razdoblju ($6,56 \times 10^5$ CFU/mL) uzorkovanja. Dvije najmanje prosječne vrijednost određene su u uzorku 5 (1×10^3 CFU/mL - zimska vrijednost, $1,75 \times 10^3$ CFU/mL - ljetna vrijednost).

Prema tome uzorak 4 sadrži najveći broj stanica kvasaca i plijesni, a uzorak 5 najmanji. Podjednak broj kvasaca i plijesni određen je u zimskom uzorkovanju u odnosu na ljetno, odnosno može se reći kako godišnje doba nije to koje diktira količinu istih u mlijeku. U sirovom mlijeku ispitivala se prisutnost kvasaca i plijesni zato jer je njihova prisutnost u direktnoj vezi s hlađenjem sirovog mlijeka obzirom da kvasci i plijesni rastu na temperaturama iznad 18°C (Habeš, 2002). Svježe sirovo mlijeko s mljekomata nije pogodno za rast i razmnožavanje kvasaca i plijesni jer oni optimalno rastu pri nižim pH vrijednostima (pH 4-5). Stoga kvasci i plijesni čine sekundarnu mikrofloru mlijeka, a do kontaminacije može doći putem zagađenog zraka i nedovoljno čistih uređaja prilikom rukovanja tijekom mužnje. Također, sirovo mlijeko se tijekom analize moglo zagrijati na temperature od 20 do 30°C koje pogoduju rastu i razmnožavanju kvasaca i plijesni (Tratnik i Božanić, 2012).

Najveća prosječna vrijednost enterobakterija određena je u uzorku 4 ($2,68 \times 10^5$ CFU/mL) u zimskom i u ljetnom ($1,14 \times 10^5$ CFU/mL). Najmanja prosječna vrijednost enterobakterija utvrđena je u uzorku 5 (1×10^2 CFU/mL) u zimskom i ljetnom (115 CFU/mL) razdoblju uzorkovanja. Prisustvo enterobakterija u namirnicama je indikator fekalnog zagađenja, tj. nedovoljne higijene tijekom mužnje, čuvanja i tretiranja mlijeka te u konačnici loše higijene prilikom prodaje putem mljekomata. Osim fekalnog zagađenja prisustvo enterobakterija može značiti kontaminaciju zemljom i vodom (Samaržija i sur., 2007).

Namirnice u kojima se utvrdi prisustvo enterobakterija se smatraju zdravstveno neispravnim. U znanstvenom mišljenju o javno zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka (HAH, 2006) opisano je istraživanje u kojem je ispitana kvaliteta mlijeka sa svih tada dostupnih mljekomata u RH. Istraživanje je trajalo godinu dana, ukupno je prikupljeno 87 uzoraka. *E. coli* O175 (VTEC ili STEC) te *Salmonella spp.* nisu utvrđene u uzorcima sirovog mlijeka. Davis i sur. (2014) u svom radu navode kako je u Engleskoj i Walesu u razdoblju 1992.-2002. od 27 epidemija čak 15 bilo uzrokovano konzumacijom nepasteriziranog mlijeka, uglavnom zbog nalaza *Salmonella spp.*, *E. coli* VTEC O157.

Kompletan grafički prikaz mikrobiološke analize u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata nalazi se na slici 14. U konačnici se može zaključiti kako niti jedan uzorak sirovog mlijeka mikrobiološki nije ispravan, odnosno kako uzorak 4 pokazuje najveću kontaminaciju mikroorganizmima.

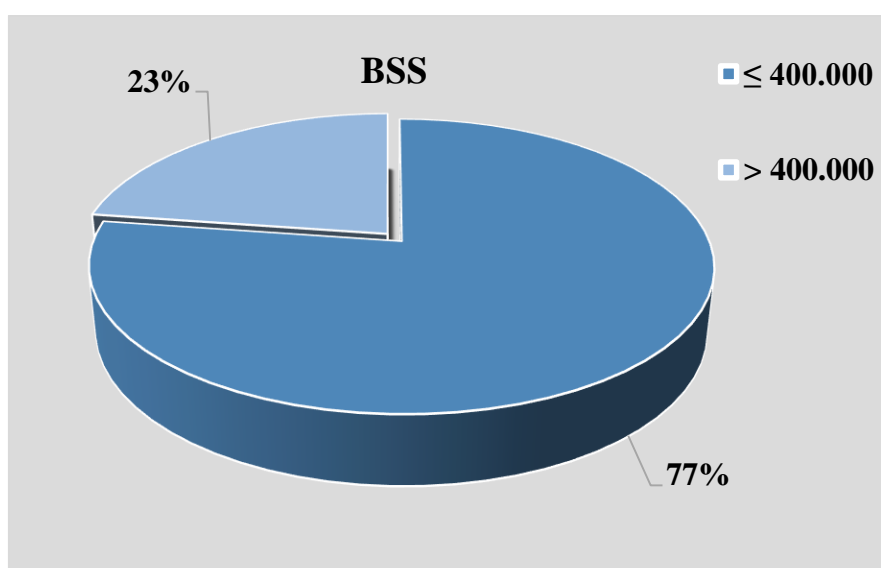


Slika 14. Rezultati mikrobiološke analize¹ sirovog mlijeka s mljekomata u zimskom i ljetnom razdoblju

¹ UB zima, UB ljeto - ukupan broj mikroorganizama., KIP zima, KIP ljeto - kvasci i plijesni., EB zima, EB ljeto - enterobakterije

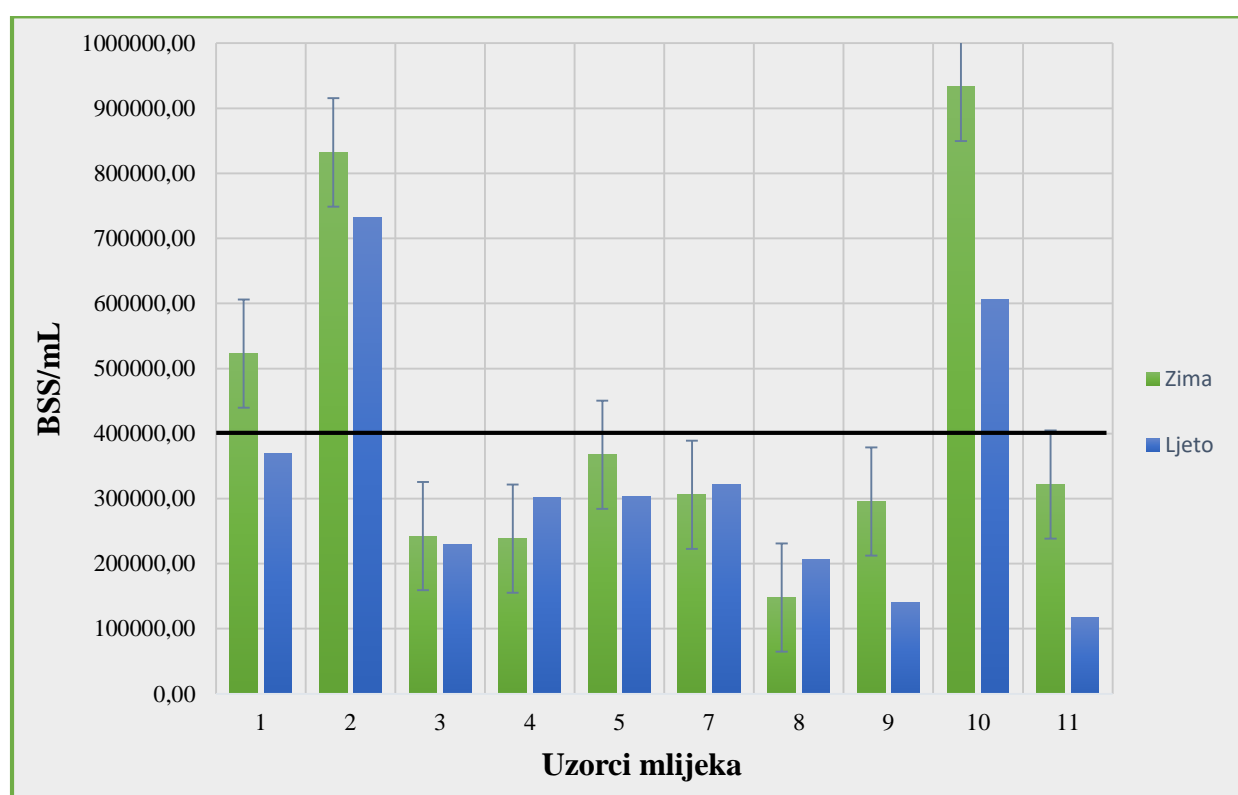
Tablica 9. Rezultati određivanja broja somatskih stanica u mlijeku

<i>Uzorak</i>	<i>Somatske stanice – BSS / mL</i>	
	Zima (\bar{X}) min - max	Ljeto (\bar{X}) min - max
<i>1</i>	522.833 445.250 - 648.250	369.000 161.500 - 577.000
<i>2</i>	832.166 605.000 - 1.265.000	732.000 504.000 - 960.000
<i>3</i>	242.333 218.000 - 287.000	229.000 183.000 - 275.000
<i>4</i>	238.333 223.000 - 250.000	301.500 280.000 - 332.000
<i>5</i>	367.333 231.000 - 599.000	303.500 270.000 - 337.000
<i>6</i>	317.583 120.000 - 516.000	-
<i>7</i>	305.933 202.250 - 455.500	321.500 303.000 - 340.000
<i>8</i>	148.000 63.000 - 276.000	140.500 120.000 - 161.000
<i>9</i>	295.666 151.000 - 567.000	140.500 120.000 - 161.000
<i>10</i>	932.916 760.000 - 1.232.500	605.500 520.000 - 691.000
<i>11</i>	321.750 264.750 - 375.500	118.000 100.000 - 136.000



Slika 15. Higijenska kvaliteta svježeg sirovog mlijeka na osnovu somatskih stanica

U tablici 9 prikazani su rezultati određivanja broja somatskih stanica (BSS) u sirovom mlijeku s mljekomata. Mlijeko s visokim brojem somatskih stanica nije higijenski ispravno za preradu i uporabu. Stoga Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17) nalaže da mlijeko ne smije imati broj somatskih stanica veći od 400.000/mL. Veliki dio uzoraka zadovoljava Pravilnik, odnosno samo uzorci 1, 2 i 10 ne zadovoljavaju. Daleko najveći prosječni broj somatskih stanica u mililitru utvrđen je u uzorku 10 i iznosio je 932.916 BSS/mL u zimskom razdoblju. Maksimalna određena vrijednost BSS bila je u uzorku 10 (1.232.500 BSS/mL). U istraživanju Mikulec i sur., (2016) kod 67,3% uzoraka utvrđeno je manje od 400.000 somatskih stanica/mL što je nešto manji postotak nego u ovom radu (77%).

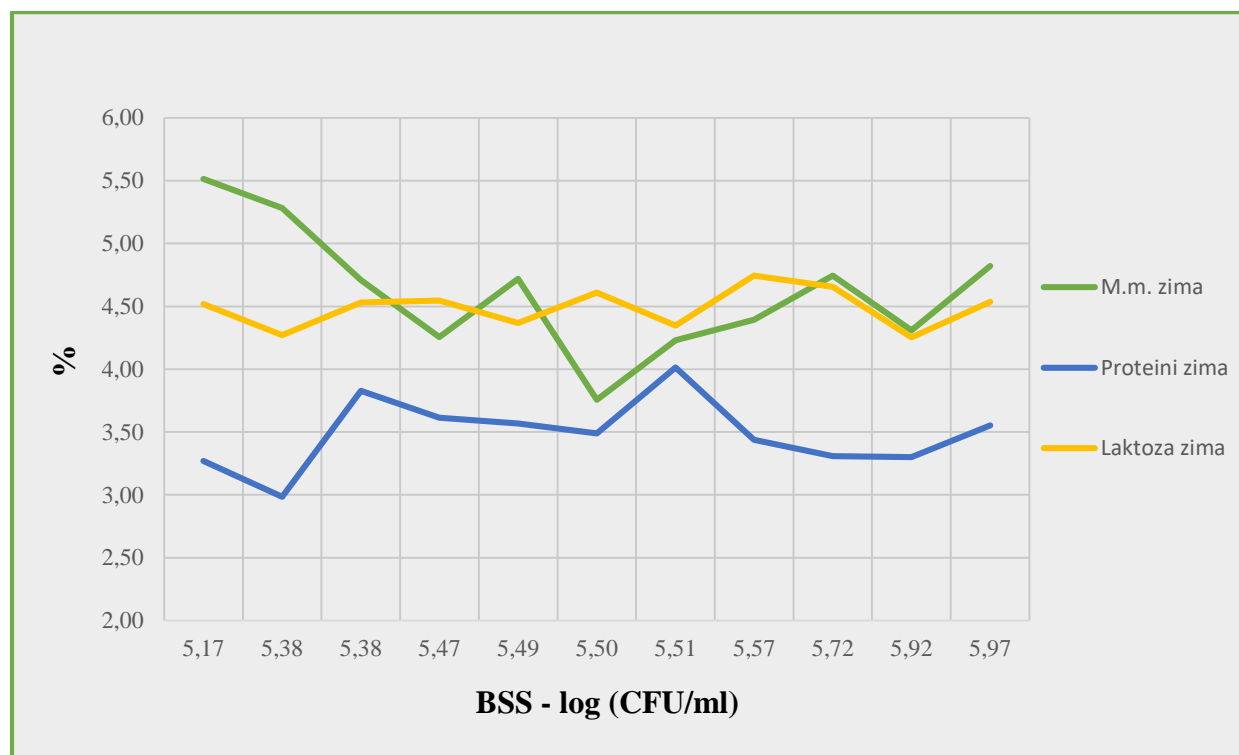


Slika 16. Prosječan broj somatskih stanica/mL u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata zimi i ljeti

Na slici 16 grafički se može vidjeti kako 5 uzoraka od ukupno 22, prikupljenih tijekom dva godišnja doba, ne zadovoljava Pravilnik. Broj somatskih stanica (BSS) pokazatelj je higijenske kvalitete mlijeka i opći je indikator zdravstvenog stanja mliječne žlijezde. Okolišni čimbenici imaju najznačajniji utjecaj na promjenu broja somatskih stanica, a na mnoge od njih utječe i proizvođač osobno.

Najvažniji čimbenici su: status infekcije vimena, dob muzare, stadij laktacije, redosljed laktacije, pasmina, način držanja, geografsko područje i godišnje doba, veličina stada, stresni čimbenici, pretjerana fizička aktivnost, mužnja i edukacija proizvođača (Čačić i sur., 2003). Stres od velike vlage u kombinaciji s hladnoćom te stres od velikih vrućina povećava mogućnost infekcije a posljedica je povećan BSS i slabija kvaliteta mlijeka (Dakić i sur., 2006). Međutim isti autori uočili su vrlo veliku varijabilnost u svom radu, u prosjeku 25%. Zemljopisno područje i godišnje doba su usko povezani s hranidbom. U ljetnom razdoblju hrana je kvalitetnija nego u zimskom, kada je ona često deficitarna s pojedinim hranjivim tvarima, što dovodi do smanjene imunološke otpornosti, dok su ljeti krave u boljoj kondiciji te otpornije, a BSS u mlijeku najniži. Veličina stada također ima utjecaj na povećan BSS iz razloga što se povećanje stada povezuje s uvođenjem muznih uređaja, a time se i povećava mogućnost infekcije (Kalit i Havranek, 1999). Prema tome u ovom istraživanju vrijednosti somatskih stanica po mililitru prosječno su uglavnom niže u ljetnom uzorkovanju, odnosno samo su u uzorcima 4 i 7 više.

Naime na grafičkom prikazu slike 17 vidi se da postotni udio sadržaja laktoze konstantno opada kako raste BSS u mlijeku s tim da je najoštrij pad kod uzorka 2 i 10. Uzorci 2 i 10 također imaju najniže vrijednosti laktoze u ovom istraživanju.



Slika 17. Kretanje udjela mliječne masti, proteina i laktoze ovisno o BSS u uzorcima sirovog mlijeka prikupljenih u zimskom razdoblju

Udio laktoze u mlijeku indikator je zdravstvenog stanja mliječne žlijezde te je usko povezan s povećanjem broja somatskih stanica (Konjačić i sur., 2015). Sadržaj mliječne masti teško je povezivati s brojem somatskih stanica obzirom da je mliječna mast parametar koji se najviše mijenja tijekom godine a i BSS je također varijabilan parametar higijenske ispravnosti mlijeka. Prema tome, ne može se sa sigurnošću potvrditi tvrdnja Antunac i sur. (1997) kako udio mliječne masti opada povećanjem broja somatskih stanica po mililitru, premda uzorci 1, 2, 10 imaju nešto manji udio mliječne masti a prosječno najveći BSS. Prema Rajčević i sur. (2003) udio proteina ne mijenja se značajno, barem ne u ovisnosti o BSS osim u međusobnom odnosu nekih frakcija.

Zbog povećanog broja somatskih stanica u mlijeku dolazi do gubitaka u proizvodnji i preradi mlijeka. S povećanjem broja somatskih stanica proizvodnja mlijeka se smanjuje, a povećavaju se troškovi liječenja i obnove stada. Manji broj somatskih stanica znači bolju kvalitetu mlijeka za preradu i veću proizvodnju, što predstavlja korist za proizvođače, prerađivače i potrošače mlijeka (Čačić i sur., 2003). Iz vodiča dobre higijenske prakse HPA (2008) može se zaključiti sljedeće:

- Krave koje su imale <200.000 somatskih stanica/mL i broj bakterija <100.000 CFU/mL su dobrog zdravlja, a mlijeko je s malo mikroorganizama. Kod tih se proizvođača provode principi dobre higijenske prakse, a mlijeko koje se proizvodi je kvalitetno.
- Krave koje su imale <200.000 somatskih stanica/mL, a >100.000 CFU/mL su krave dobrog zdravlja, ali je mlijeko puno mikroorganizama, što znači da se na gospodarstvu ne provode principi dobre higijenske prakse.
- Krave koje su imale >200.000 somatskih stanica/mL, a <100.000 CFU/mL su krave lošeg zdravlja, a u mlijeku ima malo mikroorganizama. Prisutan je mastitis, potrebno je utvrditi uzrok (najvjerojatnije je prisutan problem s muznim uređajem).
- Krave koje imaju >200.000 somatskih stanica/mL i >100.000 CFU/mL su krave lošeg zdravlja, a mlijeko je puno mikroorganizama, što znači da je prisutan problem s mastitisom, muznim uređajem i da se na gospodarstvu ne primjenjuju principi dobre higijenske prakse.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenih kemijskih i mikrobioloških analiza na uzorcima svježeg mlijeka s mljekomata, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Uzorci mlijeka kemijskim sastavom udovoljavaju odredbama Pravilnika o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/17).
2. Utvrđene su razlike u kemijskom sastavu mlijeka uzorkovanog zimi u odnosu na ono uzorkovano ljeti. Najvarijabilnijim parametrom mlijeka pokazala se mliječna mast. Prosječne vrijednosti mliječne masti, proteina i suhe tvari veće su zimi nego ljeti. Laktoza i bezmasna suha tvar u prosjeku su jednake ili malo veće ljeti nego zimi. Sadržaj pepela ostao je gotovo nepromijenjen.
3. Rezultati provedenog mikrobiološkog ispitivanja prikazuju kako je kvaliteta svježeg sirovog mlijeka iz mljekomata loša, jer niti jedan uzorak nije udovoljavao odredbama u Pravilniku.
4. Broj somatskih stanica po mililitru u sirovom mlijeku na zadovoljavajućem je nivou, obzirom da samo tri uzorka (uzorci 1, 2 i 10) od ukupno 11 analiziranih u prosjeku imaju broj somatskih stanica veći od zakonskog kriterija od 400.000/mL. Veći BSS/mL rezultirao je manjim vrijednostima laktoze u uzorcima 2 i 10.
5. Kako bi se smanjila mikrobiološka kontaminacija mlijeka potrebno je provoditi dobru higijensku praksu tijekom mužnje, transporta mlijeka do mljekomata, punjenja kao i rukovanja istim. Također bitno je održavanje sterilnih uvjeta u mljekomatima i oko njih te provođenje temeljitog pranja i čišćenja.

6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2014) Brošura o mljekomatu, <http://www.letina.com/mljekomat-brosura-a4.pdf>, pristupljeno 15. srpnja 2017.
- Anonymous 2 (2017) Određivanje mliječne masti, http://www.funke-gerber.de/FG_milkanalysis_Web.pdf, pristupljeno 24. kolovoza 2017.
- Anonymous 3 (2016) Brojač kolonija Funke Gerber, <http://www.analytics-shop.com>, pristupljeno 16. srpnja 2017.
- Anonymous 4 (2016) Određivanje somatskih stanica, <https://www.fossanalytics.com/en#4>, pristupljeno 24. kolovoza 2017.
- Antunac, N., Havranek-Lukač, J., Samaržija, D. (1997) Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. *Mljekarstvo* **47**, 183-193.
- Bašić, Z., Božanić, R., Konjačić, M., Đermadi, K., Antunac, N., Volarić, V. (2012) Kemijska i higijenska kvaliteta mlijeka. *Mljekarstvo* **62**, 251-260.
- Benić, M. (2011) Mastitisi u krava. *Mljekarski list* **3**, 1-12.
- Bendelja, D., Prpić, Z., Mikulec, N., Ivkić, Z., Havranek, J., Antunac, N. (2011) Milk urea concentration in Holstein and Simmental cows. *Mljekarstvo* **61**, 45-55.
- Bobić, T., Mijić, P., Vučković, G., Gregić, M., Baban, M., Ganter, V. (2014) Morphological and milkability breed differences of dairy cows. *Mljekarstvo* **64**, 71-78.
- Borčić, M. (2016) Utjecaj određenih okolišnih čimbenika na broj somatskih stanica u mlijeku krava na području grada Križevaca. Završni specijalistički diplomski stručni rad, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.
- Bosnić, P. (2003) Svjetska proizvodnja i kvaliteta kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **53**, 37-50.
- Božanić, R., Jelčić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.
- Claeys, W., Cardoen S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013) Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control* **31**, 251-263.

- Čačić, Z., Kalit, S., Antunac, N., Čačić, M. (2003) Somatske stanice i čimbenici koji utječu na njihov broj u mlijeku. *Mljekarstvo* **53**, 23-36.
- Dakić, A., Pintiće, N., Poljak, F., Novosel, A., Stručić, D., Jelen, T., Pintiće, V. (2006) Utjecaj godišnjeg doba na broj somatskih stanica u kravljem mlijeku isporučenom za tržište. *Stočarstvo* **60**, 35-39.
- Davis, B. J. K., Li, C.X., Nachman, K.,E. (2014) A literature review of the risk and benefits of consuming raw and pasteurised cow's milk, Center for a Livable Future, Maryland.
- Dozet, N., Stanišić, M., Sumenić, S. (1976) Ispitivanje suhe materije mlijeka raznih rasa goveda. *Mljekarstvo* **26**, 185-194.
- EFSA (2015) Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. EFSA – European Food Safety Authority. *EFSA Journal* **13**, 3940-4035.
- Feldhofer, S., Matić, G., Starčević, H (1999) Istraživanja glavnih sastojaka sirovog mlijeka krava na obiteljskim gospodarstvima. *Mljekarstvo* **49**, 95-104
- Guétouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. (2014) Composition and nutritional value of raw milk. *Iss.Biol.Sci.Pharm.* **2**, 115-122.
- Godič, K., Torkar, A., Kirbiš, S., Vadnjal, M., Biasizzo, A., Jevšenik, M., (2017) The microbiological quality of Slovenian raw milk from vending machines and their hygienic-technical conditions. *Brit. Food. J.* **119**, 377-389.
- Habeš, S. (2002) Kvalitativno-kvantitativna analiza biodiverziteta mikroorganizama sirovog i pasteuriziranog mlijeka. *Mljekarstvo* **52**, 291-313.
- Hadžiosmanović, M. (2001) Ocjena higijenske kakvoće mlijeka. U: Mastitisi (Berić, M., ured.), Gamond, Zagreb, str. 90.
- HAH (2016) Znanstveno mišljenje o javno zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka. HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2016/12/znanstveno-misljenje-o-javno-zdravstvenom-riziku-vezanom-za-konzumaciju-sirovog-mlijeka.pdf>>. Pristupljeno 13. lipnja 2017.
- Harmon, R. J. (1994) Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* **77**, 2103-2112.

Havranek, J., RupiĆ, V. (2003) Mlijeko od farme do mljekare, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

HPA (2008) Higijena mlijeka od krave do tržišta. HPA - Hrvatska poljoprivredna agencija, <<http://www.hpa.hr/wp-content/uploads/2014/07/Strucni%20prirucnik.pdf>>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

HPA (2012) 10 godina rada. HPA - Hrvatska poljoprivredna agencija, <http://www.hpa.hr/wp-content/uploads/2014/08/SLKM-10_godina_rada.pdf>. Pristupljeno 16. srpnja 2017.

HPA (2015) Godišnje izvješće za 2015. godinu. HPA - Hrvatska poljoprivredna agencija, <<http://www.hpa.hr/wp-content/uploads/2014/06/01-Uvod.pdf>>. Pristupljeno 16. srpnja 2017.

HPA (2016) Godišnje izvješće za 2016. godinu. HPA - Hrvatska poljoprivredna agencija, <<http://www.hpa.hr/wp-content/uploads/2014/06/Uvod.pdf>>. Pristupljeno 16. srpnja 2017.

ISO 9622:2001, Određivanje udjela mliječne masti, bjelancevina i laktoze (spektrofotometrijska metoda).

ISO 13366-2:2007, Određivanje broja somatskih stanica (fluoro-opto-elektronska metoda).

Jensen, R. (2002) Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* **85**, 295-350.

Kalit, S., Lukač-Havranek, J. (1999) Incidence od subclinical mastitis on the farms with various numbers of cows. *Mljekarstvo* **49**, 9-14.

Kalit, S., Kostelić, A., Štafa, Z., Feldhofer, S., Grgić, Z. (2000) Kako postići kakvoću svježeg sirovog mlijeka zadanu pravilnikom, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Kalmus, P., Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Viltrop, A. (2015) Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia. *Food Control* **51**, 135-139.

Kirin, S. (2001) Higijenska kakvoća sirovog mlijeka u svjetlu zakonskih propisa. *Mljekarstvo* **51**, 49-60.

Konjačić, M., Marković, T., Ivanković, A., Stručić, D. (2015) Utjecaj godine i sezone na kemijski sastav i higijensku kvalitetu ekološki proizvedenog kravljeg mlijeka. *Stočarstvo* **69**, 45-53.

Mikulec, N., Radeljević, B., Zamberlin, Š., Špoljarić, J., Kesić Horvat, I., Krga, M., Antunac, N., Dobranić, V., Zdolec, N. (2016) Kontrola kvalitete mlijeka iz mljekomata u cilju povećanja konkurentnosti proizvođača mlijeka. U: 42. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, (Volarić, V., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 73-74.

Naglić, T., Hajsig, D., Madić, J., Pinter, Lj. (2005) Veterinarska mikrobiologija, specijalna bakteriologija i mikologija, Zrinski d.d., Čakovec.

Oliver, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., Murinda, S.E. (2009) Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**, 792-806.

Pavičić, Ž. (2006) Mlijeko - od mužnje do sira, Gospodarski list, Zagreb, str. 138-141.

Petrović, M. D., Petrović, M. M., Nenadović, G., Kurčubić, V., Marinkov, G. (2006) Hemijski - mikrobiološki parametri kvaliteta sirovog kravljeg mleka. *Biotechnol. Anim. Husb.* **22**, 109-119.

Pintić, N., Dakić, A., Poljak, F., Stručić, D., Tomše-Đuranec, V., Jelen, T., Pintić, V. (2006) Učestalost pojave antibiotika i drugih antibakterijskih tvari u mlijeku isporučenom na tržište. *Stočarstvo* **60**, 83-95.

Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2017a) *Narodne novine* **23**, Zagreb.

Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (2017b) *Narodne novine* **64**, Zagreb.

Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (2016) *Narodne novine* **84**, Zagreb.

Pravilnik o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (2015) *Narodne novine* **84**, Zagreb.

Rajčević, M., Potočnik, K., Levstek, J. (2003) Correlations Between Somatic Cells Count and Milk Composition with Regard to the Season. *Agric. conspec. Sci.* **68**, 221-226.

Sabadoš, D. (1996) Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, Hrvatsko mljekarsko društvo, Zagreb.

Samaržija, D., Antunac, N., Pogačić, T., Sikora, S. (2004) Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije. *Mljekarstvo* **54**, 39-51.

Samaržija, D., Podoreški, M., Sikora, S., Skelin, A., Pogačić, T. (2007) Mikroorganizmi - uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **57**, 251 - 273.

Ștețca, G., Ilea, A., Șteu, L., Coldea, T. (2014) Raw milk hygiene at local markets and automatic milk dispenser machines. *Bull.Univ. Agric. Sci.* **71**,161-164.

Stručić, D. (2015) Analiza i kvaliteta mlijeka. U: Sirarstvo u teoriji i praksi, (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, str. 85-102.

Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 13-19.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 19-27.

Tremonte, P., Tiapldi, L., Succi, M., Pannella, G., Falasca, L., Capilongo, V., Coppola, R., Sorrentino, E. (2014) Raw milk from vendind machines: Effects of boiling, microwave treatmen, and refrigeration on microbiological quality. *J. Dairy Sci.* **97**, 5-6.

Uredba o izmjenama i dopuni Uredbe o ciljnoj cijeni svježeg sirovog mlijeka (2008) *Narodne novine* **81**, Zagreb.

Uremović, Z., Uremović, M., Pavić, V., Mioč, B., Mužić, S., Janječić, Z. (2002) Stočarstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Zdolec, N. (2011) Pravila higijenske mužnje. *Mljekarski list* **5**, Zagreb, str. 2-6.

Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013) *Narodne novine* **81**, Zagreb.